



Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire du muscle strié squelettique et du placenta humains

Romain Carmeille

► To cite this version:

Romain Carmeille. Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire du muscle strié squelettique et du placenta humains. Anatomie, Histologie, Anatomopathologie [q-bio.TO]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT: 2015BORD0354 . tel-01260309

HAL Id: tel-01260309

<https://theses.hal.science/tel-01260309>

Submitted on 21 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université de Bordeaux

Présentée par

Romain CARMEILLE

Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire du muscle strié squelettique et du placenta humains

Composition du jury

Mme Draeger Annette, Professeur universitaire et praticien hospitalier, Université de Berne

Rapporteur

Mme Butler-Browne Gillian, Directeur de recherche INSERM, UMPC, Paris

Rapporteur

Mr Pasquet Jean-Max, Directeur de recherche INSERM, Université de Bordeaux

Examineur

Mr Bouter Anthony, Maître de conférence, Université de Bordeaux

Directeur de thèse

Mme Déchanet-Merville Julie, Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux

Membre invité

Avant toute chose je tiens à dédier ce manuscrit et ce travail de thèse à Charlotte Tisné-Behr.



Charlotte m'a accordé sa confiance pour ma première vraie expérience dans le monde de la recherche. Elle a été une encadrante formidable, elle m'a fait réaliser un gros travail personnel parce qu'elle avait cette faculté d'analyser et comprendre les gens très rapidement. Malgré la maladie elle a toujours été disponible et m'a appris à voir toujours plus loin. Le sort a fait d'elle un souvenir que je n'oublierai jamais.

Remerciements

En premier lieu je tiens à remercier le professeur **Annette Draeger** et le docteur **Butler-Browne** pour avoir accepté de sacrifier de leur temps afin d'évaluer mon travail de thèse. Professeur Draeger je vous suis d'autant plus reconnaissant depuis que je sais que le français n'est pas votre langue de prédilection. Je tiens également à remercier le docteur **Jean-Max Pasquet** pour avoir accepté de revêtir à nouveau le costume de membre de jury, et ce malgré le fait qu'il ait déjà connu la situation d'être membre du jury de ma très longue présentation de mi-thèse. Il y a des actes de bravoure comme celui-ci qu'il faut saluer. Je tiens à remercier **Julie Déchanet-Merville** pour m'avoir fait la surprise d'accepter de venir en « guest-star » pour mon oral de thèse. Je ne pouvais avoir meilleure surprise que celle de l'opportunité de présenter mes travaux de thèse devant, au moins, un éminent membre du CIRID.

Je remercie également le professeur **Alain Brisson** pour m'avoir donné le privilège de faire partie de son groupe de recherche pendant 3 années très enrichissantes sur le plan scientifique et personnel. Sachez monsieur Brisson, qu'après vous avoir connu comme étant un des meilleurs enseignants que j'ai pu avoir durant mes jeunes années sur les bancs de l'université, j'ai eu le plaisir de vous connaître comme étant un excellent directeur d'équipe, un chercheur passionné, un travailleur acharné et un orateur captivant. « Il y a des Hommes qui sont fer et d'autres qui sont aimants » comme l'a écrit Victor Hugo.

Je remercie particulièrement **Jean-Pierre Renaudin**, **Michel Moenner**, **Florence Ottonnes**, **Clothilde Billottet** et tout le personnel enseignant de l'université de Bordeaux que j'ai pu côtoyer, pour m'avoir donné l'opportunité de faire mes premiers pas, dans les meilleures conditions, en tant que moniteur à l'université. Michel, tu fais partie de ces enseignants passionnés qui ont nourri mon intérêt pour les sciences et qui ont été un des moteurs pour la poursuite de mes études. Sache que je t'en suis reconnaissant.

Je remercie également **Flora Bouvet** pour sa disponibilité, pour sa patience et sa gentillesse. Flora, sans ton aide l'organisation de la plupart des TP aurait été beaucoup plus fastidieuse qu'elle ne l'a été. J'ai appris de toi que derrière chaque pipette rangée il y a une Flora Bouvet. Maintenant je ferai plus attention, merci pour cela.

Je tiens à remercier le personnel actuel et passé du CBMN pour avoir fait de ces 3 années une période agréable à vivre. Merci à **Sylvie Poussard** et **Elise Dargelos** de ne pas avoir « craqué » devant toutes mes tentatives pour leur subtiliser du matériel de recherche et des anticorps, merci aussi pour votre disponibilité. Merci à **Marie-Christine Gerbod-Giannone** pour sa curiosité et son amitié. Merci également au docteur **Annelise Sahin** pour sa sympathie, sa joie de vivre mais aussi pour ses tentatives répétées et infructueuses de me sociabiliser avec plus de personne dans le laboratoire.

Merci à **Clémence Neurohr** pour tous les débats animés que nous avons eus ensemble, et l'optimisme dont elle a fait preuve au quotidien.

Merci à mon équipe pour m'avoir supporté pendant, j'en suis sûr, 3 années longues et harassantes. A **Romain Linares** et à **Nicolas Arraud** merci pour votre amitié et votre humour, ces 3 années en votre compagnie auront été bien agréables et distrayantes. Merci à **Céline Gounou** pour sa disponibilité, sa patience durant ma formation à la paillasse pour la rigueur dont elle a toujours fait preuve et pour son énergie au quotidien. Céline je ne m'excuserai pas de t'avoir envoyé tous ces sms tennis-Federer la nuit car ce fut un plaisir que d'empêcher ton mari fort sympathique de dormir.

Mes pensées se tournent également vers mon groupe d'entraînement de demi-fond court dit « Team Chaillou ». **Abdellatif Bensahla, Cédric Barlet, Medhi Barchouchi, John Lhermite**, les frères **Jean-Marault** et tous ceux avec qui nous avons donné le maximum pour à la fois la passion de courir et l'envie d'aller toujours plus loin. Les mecs, sans vous, tout aurait été très différent. Nous pratiquons un sport très dur. Ensemble nous avons affronté la boue, la neige, le froid, la pluie, la douleur mais grâce à vous et ce sport j'ai appris plein de choses. Je vous dois une partie de la combativité, l'esprit d'équipe et l'opiniâtreté que j'ai mis dans mes études et au travail. Vous m'avez beaucoup « charrié » avec ce doctorat et bien maintenant vous y êtes aussi.

A vous, à ma mère, à ma tante préférée **Anne-Marie**, je dois la conscience que quand bien même on possède un talent quelconque, il n'y a pas de succès sans sacrifice et sans travail. Merci à mes grands-parents, qui ne sont malheureusement plus là, leurs efforts et sacrifices sont pour moi une source de motivation.

Evidement je ne peux que remercier mon directeur de thèse, le docteur **Anthony Bouter**. Anthony, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir fait confiance pour ce travail. Tu as été vraiment disponible, à l'écoute et extrêmement patient avec moi. Je sais que ça n'a pas dû être facile pour toi car je suis ton premier « thésard » et j'espère que tu en voudras d'autres après moi. Tu es quelqu'un de vraiment impressionnant car tu fais partie de ces gens qui réussissent du premier coup tout ce qu'ils entreprennent et je ne peux être qu'admiratif de l'homme que tu es. Tu m'as fait confiance dès le début, tu m'as toujours abordé comme ton égal, tu as été attentif à mes suggestions, tu m'as laissé beaucoup de liberté dans mon travail tout en me rappelant à l'ordre quand je m'éparpillais dans mes expériences. Tu as été surtout imperturbable, toujours agréable et souriant malgré ce qui t'est arrivé durant cette période. Je crains déjà de ne jamais retrouver quelqu'un comme toi.

A tous mes amis les plus fidèles que je ne vois que trop rarement : **Cédric Barlet** une nouvelle fois, **Thomas Manuel Acien, Anthony Acien, Nicolas Mallet, Julie, Romain Giraud, Valentin Laurent, Hughes Roger, Guillaume Carnir, Laetitia Wantz** et tous les autres. Romain et Thomas sans vous je me serais beaucoup ennuyé, vous m'avez appris qu'il y a des gens sur lesquels on peut faire confiance. Merci pour tout.

A ma petite sœur **Stéphanie** pour qui je serai toujours là.

Je tiens évidemment à remercier tous ces enseignants, chercheurs, passionnés et passionnants que j'ai croisé durant mes années d'études, qui ont fait grandir en moi l'intérêt que j'avais depuis tout petit pour les sciences et maintenant pour la recherche et sans qui, j'en suis persuadé, je ne serais pas en train d'écrire ce manuscrit de thèse. Je pense à **Christophe Cullin**, à **Vincent Parissi**, à **Michel Moenner**, à **Frédéric Garabetian**, à **Jean Haxaire**, à **Jean-François Moreau** et à **Alain Brisson**.

Merci à tous ceux qui ont d'une certaine façon contribué à faire qui je suis, parce que :

« Le paradoxe de la condition humaine, c'est qu'on ne peut devenir soi-même que sous l'influence des autres ». Boris Cyrulnik

Résumé :

La membrane plasmique est un assemblage supramoléculaire qui délimite la cellule. C'est une structure fine, complexe et dynamique assurant des fonctions multiples et vitales pour la cellule. Sa rupture est un événement physiologique pour les cellules soumises à des stress mécaniques fréquents et/ou importants, comme les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou les cellules musculaires. Dans des conditions physiopathologiques, la membrane plasmique peut également être endommagée par l'insertion de toxines bactériennes formant des pores (PFTs, pour « pore forming toxins »). Le processus de réparation membranaire et la machinerie protéique associée sont encore mal connus. Connaître les partenaires protéiques et comprendre les mécanismes mis en jeu durant le processus de réparation de la membrane plasmique sont deux enjeux fondamentaux majeurs. En effet, il a été établi qu'une défaillance du processus de réparation membranaire pour les fibres musculaires est la cause principale de certaines dystrophies musculaires.

La machinerie protéique de réparation comprend des protéines comme la dysferline, la cavéoline-3 et certaines Annexines (Anx). Les Anx appartiennent à une superfamille de protéines répandue chez la plupart des eucaryotes, qui ont la propriété commune de se lier aux membranes biologiques en présence de calcium (Ca^{2+}). Certaines Anx, comme l'AnxA5, une fois liées aux membranes biologiques s'auto-assemblent spontanément en réseau-2D.

Lors de ce travail de thèse, nous avons étudié le rôle de l'AnxA5 dans la réparation membranaire des trophoblastes placentaires et des cellules du muscle squelettique humain. Pour les deux types cellulaires, nous avons montré que l'AnxA5 est un acteur indispensable du processus de réparation membranaire dans le cas de ruptures mécaniques. En associant des approches de microscopie de fluorescence et de microscopie électronique à transmission (MET), nous avons mis en évidence que, dans ces cellules le mécanisme de réparation est principalement basé sur la formation d'un « patch » lipidique. Dans les cellules musculaires, les expériences de MET ont mis en évidence qu'un pool d'AnxA5 endogène se lie aux bords du site de rupture quelques secondes après la lésion du sarcolemme. Ceci suggère qu'après rupture de la membrane plasmique, l'augmentation locale de la concentration calcique intracellulaire provoque la liaison de l'AnxA5 spécifiquement aux bords de la région membranaire lésée où elle forme un réseau-2D. Le réseau-2D stabiliserait localement la membrane et préviendrait sa déchirure, induite par les forces de tensions exercées par le cytosquelette cortical.

Nous avons également montré que l'AnxA5 ne semble pas impliquée dans la réparation de la membrane plasmique après insertion de PFTs. Ceci suggère que différents mécanismes de réparation existent et que leur mise en place dépend probablement du type ou de l'importance des dommages.

Finalement nous avons étendu notre étude à des lignées cellulaires établies à partir de patients diagnostiqués comme souffrant de dystrophies des ceintures de type 2B (déficience en dysferline) et 1C (déficience en cavéoline-3), respectivement. Nous avons montré, pour ces lignées, que la déficience en dysferline ou cavéoline-3 provoque un défaut de réparation dans

le cas des ruptures mécaniques de la membrane plasmique. Dans ces cellules musculaires pathologiques intactes ou endommagées, l'AnxA5 a le même comportement, ce qui suggère que l'action de l'AnxA5 est indépendante de ces protéines. A la différence des cellules déficientes en dysferline, nous avons observé que les cellules déficientes en cavéoline-3 sont capables de réparer efficacement des lésions créées par l'insertion de PFTs dans le sarcolemme. Ce résultat supporte l'hypothèse de l'existence de plusieurs mécanismes de réparation.

En conclusion, ce travail montre que l'AnxA5 est un composant clé de la machinerie de réparation dans le cas des ruptures mécaniques.

Mots-clés: Annexine-A5, Réparation membranaire, Muscle strié squelettique humain, Trophoblastes humains, Dystrophies musculaires, Toxines formant des pores, Microscopie confocale, Rupture mécanique par irradiation laser, Microscopie électronique à transmission.

Abstract:

Plasma membrane is the supramolecular assembly that delimits the cell. It is a thin, dynamic and complex structure, ensuring multiple and vital cell functions. Its disruption is a physiological event occurring in cells submitted to frequent mechanical stresses, such as endothelial cells, epithelial cells and muscle cells. It is also a physiological event for cells exposed to pore forming bacterial toxins (PFTs). Membrane repair mechanisms and associated protein machinery are still poorly understood. This knowledge is, however, essential for obvious physiopathological issues. Indeed, a defect of membrane repair in muscle cells leads to some muscular dystrophies. Membrane repair machinery includes proteins such as dysferlin, MG-53, caveolin-3 and some Annexins (Anx). Anx belong to a superfamily of proteins widely spread in most of eukaryotes, which share the property of binding to biological membranes in the presence of calcium (Ca^{2+}).

Here, we investigated the role of AnxA5 in cell membrane repair of human trophoblastic and skeletal muscle cells. We showed that AnxA5 is required for membrane repair of mechanical damages in the two cell types. By combining fluorescence and transmission electron microscopy approaches, we evidenced that membrane repair mechanism in these cells is based on the formation of a lipid “patch”. In human muscle cells, TEM experiments revealed that a pool of endogenous AnxA5 binds to the edges of the torn sarcolemma as soon as a few seconds after membrane disruption. Our results suggest the following mechanism: triggered by the local increase in Ca^{2+} concentration, AnxA5 molecules bind to PS exposed at the edges of the torn membrane, where they self-assemble into 2D arrays. The formation of 2D arrays strengthens the damaged sarcolemma, counteracts the tensions exerted by the cortical cytoskeleton and thus prevents the expansion of the tear. We showed also that a pool of endogenous AnxA5 binds to intracellular vesicles that obstruct the wounding site. It is likely these vesicles, once associated one to each other, ensure membrane resealing.

Our results suggest that sarcolemma repair of damages caused by PFTs is independent of AnxA5. Therefore, different membrane repair mechanisms may exist, their occurrence probably depending on the type and/or the size of damages.

Finally, we performed studies on muscle cells established from patients diagnosed with limb-girdle muscular dystrophies type 2B (dysferlin-deficient) and 1C (caveolin-3-deficient), respectively. We found that dysferlin or caveolin-3 deficiency leads to a defect of membrane repair, in the case of mechanical damages. AnxA5 behaved similarly in these damaged cells and wild-type cells, suggesting that its function is independent of dysferlin or caveolin-3. Unlike dysferlin-deficient cells, damages created by PFTs are efficiently repaired in caveolin-3-deficient cells. This result supports the hypothesis that different mechanisms occur in muscle cells, depending on the type of damage. In conclusion, this work indicates that AnxA5 is a key component of the membrane repair machinery, in the case of mechanical disruptions. Our results enable to propose a detailed mode of action for AnxA5.

Keywords: Annexin-A5, Cell membrane repair, Human skeletal muscle, Human trophoblasts, Muscular dystrophies, Pore forming toxins, Confocal microscopy, Plasma membrane rupture by laser irradiation, Transmission electron microscopy.

Sommaire

<u>Introduction :</u>	1
<u>Chapitre n°1 : Membrane plasmique, homéostasie calcique et réparation membranaire</u>	
<u>A. Membrane plasmique et homéostasie calcique</u>	1
A1. Généralités sur la membrane plasmique	1
A2. Homéostasie calcique	9
<u>B. Réparation membranaire</u>	12
B1. Mise en évidence de ruptures membranaires physiologiques	12
B2. Les mécanismes de réparation de la membrane plasmique actuellement proposés	15
B2.a. Réparation spontanée de la bicouche lipidique ou modèle du « self-sealing »	16
B2.b. Modèle de réduction de la tension membranaire de surface par exocytose	17
B2.c. Modèle du « patch » lipidique	18
B2.d. Modèle du vertex-fusion	20
B2.e. Modèles de réparation pour les membranes endommagées par des PFTs	23
B2.e.1-Modèle du bourgeonnement membranaire	23
B2.e.2-Modèle de réparation par endocytose	25
B3. La machinerie protéique de réparation de la membrane plasmique	27
B3.a. Les protéines à activité Ca^{2+} -indépendante	27
B3.a1-Les protéines du cytosquelette	27
B3.a2-Les SNAREs	30
B3.a3-Les complexes ESCRT	32
B3.a4-La protéine MG53 (ou TRIM72)	34
B3.a5-La cavéoline-3	36
B3.a6-AHNAK/Desmoyokine	41
B3.a7-Les canaux calciques	42
B3.b. Les protéines à activité Ca^{2+} -dépendante	42
B3.b1-Les protéines à domaine C2	43
B3.b2-Les protéines à domaine de liaison au Ca^{2+} de type « EF-hand »	50
B3.b3-Les Annexines	52
<u>Chapitre n°2 : Les Annexines</u>	54
<u>A. Présentation générale de la superfamille des Annexines</u>	54
<u>B. Structure et fonctions des Annexines</u>	54
B1. Structure des Annexines	55
B2. Fonctions des Annexines	57
<u>C. Annexines et réparation membranaire</u>	62
C1. Annexine-A1 et réparation membranaire	62

C2. Annexine-A2 et réparation membranaire.....	66
C3. Annexine-A5 et réparation membranaire.....	67
C4. Annexine-A6 et réparation membranaire.....	68
<u>Chapitre n°3 : Le tissu musculaire strié squelettique</u>	71
A. Anatomie et organisation subcellulaire du muscle strié squelettique.....	72
A1. Organisation générale des muscles striés squelettiques.....	72
A2. Organisation des fibres musculaires.....	74
B. La contraction musculaire.....	78
B1. Les myofilaments.....	78
B2. Schéma général de la contraction d'un muscle strié squelettique.....	79
C. Développement et régénération du muscle strié squelettique.....	80
C1. La myogénèse.....	80
C2. La régénération du muscle strié squelettique.....	82
<u>Chapitre n°4 : Les pathologies du muscle strié squelettique</u>	84
A. Le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (DAPC : Dystrophin-Associated Protein Complex).....	
B. Les dystrophies des ceintures (Limb-Girdle Muscular Dystrophy).....	88
C. Les myopathies distales.....	88
D. Les dysferlinopathies.....	88
E. Les cavéolinopathies.....	90
<u>Chapitre n°5 : Le placenta</u>	96
A. Présentation générale.....	96
B. Structure du placenta mature.....	97
C. Développement du placenta : placentation.....	98
D. Le syncytiotrophoblaste.....	101
Objectifs	103
<u>Matériel et méthodes :</u>	104
A. Culture cellulaire.....	105
A1. Modèles cellulaires.....	106
A2. Supports de culture.....	106
A3. Milieux de culture.....	107
A3.a. Prolifération cellulaire.....	107
A3.b. Différenciation cellulaire.....	109
A4. Entretien des cellules en culture.....	109
A4.a. Réensemencement.....	110
A4.b. Cryoconservation.....	110
B. Microscopie.....	110

B1. Microscopie à transmission et épifluorescence	110
B1.a. Microscopie photonique en lumière blanche	110
B1.b. Microscopie photonique à épifluorescence	110
B2. Microscopie confocale	111
<u>C. Western Blot</u>	112
C1. Préparation des extraits protéiques totaux	112
C2. Dosage des extraits protéiques	112
C3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturantes (SDS-PAGE)	112
C4. Transfert des protéines	113
C5. Détection immunologique des protéines d'intérêt	113
C6. Témoin de charge pour le western blot	115
<u>D. Rupture ou perforation de la membrane plasmique <i>in vitro</i> et réparation membranaire</u>	115
D1. Témoin de rupture et réparation membranaire	115
D2. Cas des ruptures mécaniques induites par irradiation laser	116
D2.a. Préparation des cellules avant irradiation	116
D2.b. Rupture membranaire	117
D3. Cas des perforations de la membrane plasmique par utilisation de la toxine bactérienne Streptolysine O	
D3.a. Réparation membranaire	117
D3.b. Localisation des protéines endogènes dans les cellules endommagées	118
<u>E. Immunocytofluorescence : Localisation des protéines endogènes dans les cellules intactes et endommagées</u>	
E1. Dans les cellules intactes	118
E2. Dans les cellules endommagées	118
E3. Protocole d'observation des cellules endommagées	119
E4. Microscopie corrélative	119
<u>F. Annexines extracellulaires</u>	120
F1. Localisation de l'Annexine-A5 extracellulaire dans les cellules musculaires endommagées	120
F2. Annexine-A5 extracellulaire et réparation membranaire	120
<u>G. Imagerie en temps réel : EGFP-Annexine-A5</u>	121
G1. Amplification et extraction du plasmide pDEST14 EGFP-Annexine-A5	121
G2. Transfection des myoblastes	121
G2.a. Transfection reverse (cellules décollées du support de culture)	121
G2.b. Transfection forward (cellules adhérentes au support de culture)	122
G3. Transfection des myotubes	122
G4. Observation des cellules EGFP-Annexine-A5	122
<u>H. Diminution (knock-down) de l'expression de l'Annexine-A5 dans les myotubes : interférence par des petits ARN à structure en épingle à cheveux (ARNsh) et utilisation de particules lentivirales recombinantes</u>	
H1. Partie théorique	123
H1.a. Les petits ARN interférants (small interfering RNA ou ARNsi)	124

H1.b. Les petits ARN à structure en épingle à cheveux (short hairpin RNA ou ARNsh).....	124
H1.c. Les vecteurs lentiviraux.....	125
H1.d. Production de particules lentivirales.....	126
H2. Partie pratique.....	127
I. Test de contractilité des myotubes <i>in vitro</i>	128

Résultats et conclusions :.....129

Partie A : Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines.

Chapitre n°1 : Caractérisation des modèles cellulaires.....129

<u>A. Lignée modèle de muscle strié squelettique humain sain : LHCN-M2</u>	130
A1. Taille, morphologie et capacité à fusionner.....	130
A2. Organisation du cytosquelette et test de contractilité.....	133
<u>B. Lignées modèles de dystrophies musculaires</u>	137
B1. Modèle de dystrophie des ceintures de type 2B : lignée 578.....	137
B1.a. Taille, morphologie et capacité à fusionner.....	141
B1.b. Organisation du cytosquelette et test de contractilité.....	141
B1.c. Expression et distribution subcellulaire de la dysferline.....	142
B2. Modèle de dystrophie des ceintures de type 1C : lignée 650.....	143
B2.a. Taille, morphologie et capacité à fusionner.....	143
B2.b. Organisation du cytosquelette et test de contractilité.....	146
B2.c. Expression et distribution subcellulaire de la cavéoline-3.....	147
<u>C. Conclusion</u>	149

Chapitre n°2 : Capacité de réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines saines et pathologiques

<u>A. Rupture mécanique par irradiation laser</u>	154
A1. Approche expérimentale.....	154
A2. Cas de la lignée LHCN-M2.....	157
A3. Cas de la lignée pathologique 578.....	159
A4. Cas de la lignée pathologique 650.....	161
A5. Conclusion.....	163
<u>B. Perforation de la membrane plasmique par la Streptolysine O</u>	164
B1. Approche expérimentale.....	164
B2. Cas de la lignée saine LHCN-M2.....	167
B3. Cas de la lignée pathologique 578.....	169
B4. Cas de la lignée pathologique 650.....	171
B5. Conclusion.....	173

Chapitre n°3 : Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire du muscle strié squelettique humain sain.....175

A. Expression et distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les cellules LHCN-M2 intactes	175
B. Distribution subcellulaire et trafic de l'Annexine-A5 dans les cellules LHCN-M2 endommagées	178
B1. Cas des ruptures mécaniques par irradiation laser	179
B1.a. Localisation de l'Annexine-A5 endogène	179
B1.b. Suivi de l'EGFP-Annexine-A5	182
B1.c. Suivi d'Annexine-A5 extracellulaire fluorescente	183
B2. Cas des perforations membranaires par la SLO	185
B2.a. Localisation de l'Annexine-A5 endogène	185
B2.b. Suivi de l'EGFP-Annexine-A5	187
C. Conséquence de la diminution de l'expression d'Annexine-A5 endogène sur la réparation membranaire des myotubes LHCN-M2	189
C1. Knock-down de l'expression de l'Annexine-A5 endogène	189
C2. Cas des ruptures mécaniques par irradiation laser	191
C3. Cas des ruptures avec perforation de la membrane par la SLO	192
D. Effet de l'ajout d'Annexine-A5 extracellulaire sur la réparation membranaire des myotubes déficients en Annexine-A5	194
D1. En présence d'Annexine-A5 extracellulaire sauvage	194
D2. En présence du mutant d'Annexine-A5	195
E. Conclusion	195

Chapitre n°4 : Comportement de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire de cellules musculaires striées squelettiques dans un contexte pathologique

A. Cas de la lignée 578	198
A1. Expression et distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les cellules 578 intactes	199
A2. Distribution subcellulaire et trafic de l'Annexine-A5 dans les cellules 578 endommagées	199
A2.a. Cas des ruptures mécaniques par irradiation laser	199
A2.b. Cas des perforations membranaires par la SLO	201
B. Cas de la lignée 650	202
B1. Expression et distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les cellules 650 intactes	202
B2. Distribution subcellulaire et trafic de l'Annexine-A5 dans les cellules 650 endommagées	203
B2.a. Cas des ruptures mécaniques par irradiation laser	203
B2.b. Cas des perforations membranaires par la SLO	205
C. Conclusion	205

Partie B : Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire des cellules trophoblastiques humaines	207
Article n°1: "Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts"	
Article n°2: "Review: Annexin-A5 and cell membrane repair"	
<u>Discussion générale</u>	209
<u>Bibliographie</u>	215

Abréviations

µm : Micromètre

µM : Micromolaire

Actine-F : Filament d'actine ou actine sous forme polymérisée

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ALG-2 : Apoptosis linked gene-2

Anx : Annexine

AnxA1 : Annexine-A1

AnxA2 : Annexine-A2

AnxA5 : Annexine-A5

AnxA6 : Annexine-A6

ARN : Acide ribonucléique

ARNi : Interférence par ARN

ARNsh : Petit ARN à structure en épingle à cheveux

ARNsi : Petit ARN interférant

ATP : Adénosine triphosphate

Bandes A : Bandes anisotropes

Bandes I : Bandes isotropes

BSA : Albumine de sérum de bœuf

C.elegans : *Caenorhabditis elegans*

C2C12 : Lignée murine de muscle strié squelettique (myoblastes)

CaM-kinases : Protéines kinases Ca^{2+} /calmoduline-dépendantes

CCV-D : Canaux calciques voltage-dépendant

CHO : Chinese hamster ovary, lignée cellulaire dérivée d'ovaire d'hamster de Chine

CK : Créatine kinase

CT : Cytotrophoblaste

Cy3 : Cyanine-3

DAPC : Complexe protéique associé à la dystrophine

DPBS : Tampon phosphate salin de Dubelcco

DHPR : Dihydropyridine

DMEM : Milieu d'Eagle modifié par Dubelcco

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

EGF : Facteur de croissance épidermique

EGFP : Enhanced green fluorescent protein

EGTA : Ethylène glycol tétra-acétique

ESCRT : Complexe de tri endosomal requis pour le transport

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

FRET : Microscopie basée sur le principe du transfert d'énergie par résonance de type Förster

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFP : Green fluorescent protein

GTP : Guanosine triphosphate

hCG : Gonadotropine chorionique humaine

H-CK : HyperChémie

HEK293: Human embryonic kidney 293

Hela : Acronyme pour Henrietta Lacks ; lignée tumorale humaine du col de l'utérus

hPL ou hCS : Lactogène placentaire humain

IRM : Imagerie par résonance magnétique

kDa : Kilo-dalton

L6E9 : Lignée cellulaire dérivée de myoblastes de muscle strié squelettique de rat

LGMD : Dystrophie musculaire des ceintures

LQTS : Syndrome du QT long congénital

MD ou DM : Myopathie distale

MDA-MB-231 : Lignée cellulaire épithéliale humaine dérivée d'adénocarcinome métastatique de glande mammaire

MEC : Matrice extra-cellulaire

MG53 : Mitsugumin 53

MHC : Chaîne lourde de myosine

MLC : Chaîne légère de myosine

mM : Millimolaire

mW : Milliwatt

Myog : Myogénine

NLS : Signal de localisation nucléaire

nm : Nanomètre

NO : Oxyde nitrique

NRK : Normal *Rattus norvegicus* kidney lignée cellulaire dérivée de fibroblastes de rein de rat

Pax : Paired box ; facteur de transcription

PC : Phosphatidylcholine

PC12 : Lignée cellulaire tumorale (phéochromocytome) de rat. Dérivée de cellules chromaffines de glande surrénale

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PE : Phosphatidyléthanolamine

PFT : Toxines formant des pores

PGH : Hormone de croissance placentaire

pH : Potentiel hydrogène

PI : Phosphatidylinositol

PIP₂ : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKC : Protéines Kinases C

PS : Phosphatidylsérine

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

Réseau-2D : Réseau bidimensionnel

RGM1 : Lignée cellulaire dérivée de la muqueuse gastrique de rat

RMD : Syndrome du muscle roulant

RS : Réticulum Sarcoplasmique

Ryr : Récepteur à la ryanodine

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SIDS : Syndrome de mort subite du nourrisson

SLO : Streptolysine O

SMA: Sphingomyélinases acide

SMN: Sphingomyélinases neutre

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor

ST : Syncytiotrophoblaste

SVF : Sérum de veau fœtal

Swiss 3T3 : lignée murine de fibroblastes dérivées de tissus embryonnaires de souris albinos Swiss

Syt-I : Synaptotagmine I

Syt-VII : Synaptotagmine VII

TBS-T : Tris-buffered saline and Tween 20

TRIM : Motif tripartite

Tubule-T : Tubule transverse

UV : Rayonnement ultraviolet

VAMP : Protéine associée à la membrane des vésicules

VCC : Cytolysine de *Vibrio Cholerae*

Introduction

Chapitre n°1 : Membrane plasmique, homéostasie calcique et réparation membranaire

La membrane plasmique forme une barrière sélective qui régule l'homéostasie cellulaire, permettant le maintien des différences de composition entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. A l'interface entre les milieux intra- et extracellulaires, elle constitue une organelle soumise à de nombreuses contraintes liées à l'environnement extérieur et à l'activité métabolique cellulaire. Ces contraintes peuvent aboutir à sa rupture, phénomène qui peut être catastrophique pour la vie de la cellule, sans mécanisme de réparation rapide.

Afin de faciliter la compréhension des principaux mécanismes de réparation membranaire, nous allons aborder brièvement comment est structurée la membrane plasmique, comment le calcium (Ca^{2+}) est régulé dans une cellule et quelles peuvent être les causes principales de la rupture de la membrane plasmique *in vivo*.

A. Membrane plasmique et homéostasie calcique :

A1. Généralités sur la membrane plasmique

En dépit de leurs différentes fonctions, toutes les membranes biologiques ont une structure générale commune. Elles sont composées majoritairement de lipides (environ 50% de la masse totale pour les cellules animales) et de protéines, associées par des interactions non-covalentes (Boesze-Battaglia et Schimmel 1997). Les phospholipides, et particulièrement les glycérophospholipides, constituent le groupe le plus abondant dans les membranes biologiques. Ce sont des molécules amphiphiles qui possèdent une partie appelée « tête » polaire composée par un groupement phosphate et un résidu glycérol reliés à deux résidus d'acide gras qui constituent la partie appelée « queue » apolaire (**Figure 1.1**). Deux types d'acides gras entrent dans la composition des phospholipides membranaires : les acides gras saturés et les acides gras insaturés. Un acide gras est dit saturé lorsque la chaîne hydrocarbonée qui le compose est dépourvue de doubles liaisons carbone-carbone, alors qu'un acide gras est dit insaturé si la chaîne hydrocarbonée contient au moins une double liaison carbone-carbone en configuration « cis » (**Figure 1.1**). La présence de doubles liaisons a pour effet de courber les chaînes hydrocarbonées des acides gras insaturés, modifiant ainsi la topologie des phospholipides membranaires et les propriétés physico-chimiques des membranes.

Les phospholipides étant des molécules amphiphiles, ils s'assemblent sous forme de bicouche dans un environnement aqueux. En effet, les queues apolaires des phospholipides se regroupent d'une manière qui minimise leur surface d'interaction avec l'eau, et forment des structures stables en bicouche, dont l'épaisseur totale est de l'ordre de 5nm (**Figure 1.2**).

Introduction

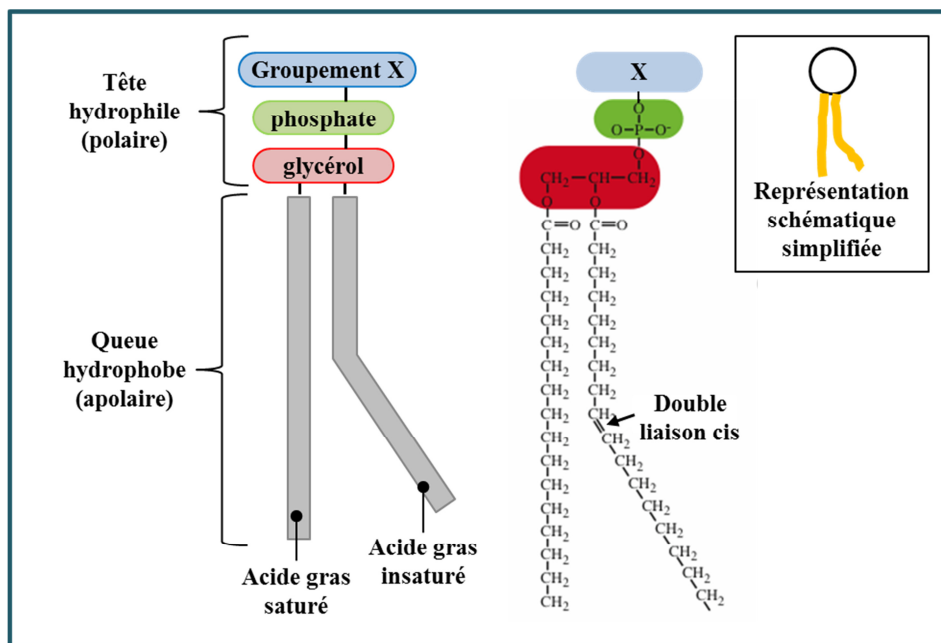


Figure 1.1 : Structure générale d'un phospholipide. Les glycérophospholipides constituant les membranes biologiques sont composés d'une chaîne d'acide gras saturée et d'une chaîne gras (poly)insaturée. Cette partie hydrophobe de la molécule est reliée à un groupement phosphate et un groupement X par le biais d'une molécule de glycérol. L'ensemble glycérol-phosphate-X constitue la partie, appelée « tête » polaire des phospholipides. La présence de doubles liaisons carbone-carbone en configuration « cis » provoque la courbure des chaînes d'acides gras polyinsaturés ayant des conséquences importantes sur la topologie des glycérophospholipides et sur les propriétés physicochimiques des membranes. Figure adaptée de (« Thermodynamics 5: Lipid bilayers - Biological Physics - biologicalphysics.iop.org » 2015).

Cette structure est stabilisée par l'établissement de liaisons hydrogènes entre les têtes polaires et les molécules d'eau. La formation d'une bicouche plane n'est pas stable puisque les queues hydrophobes aux bords de la structure sont encore en contact avec l'eau. En solution, les bicouches lipidiques se replient sous la forme de sphères, appelées liposomes. Ce réarrangement est connu sous le terme « d'effet hydrophobe ».

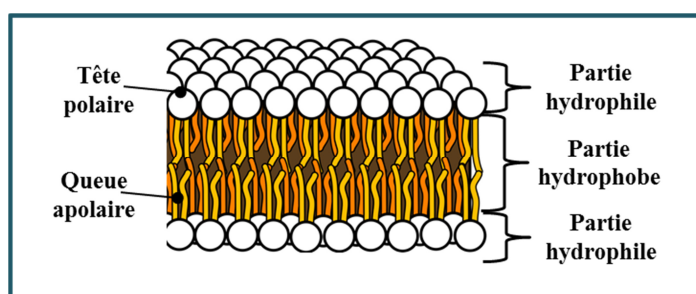


Figure 1.2 : Représentation schématique de la structure d'une bicouche phospholipidique. En solution aqueuse, les phospholipides, qui sont des molécules amphiphiles, se regroupent d'une manière qui minimise la surface de contact entre les molécules d'eau environnantes et les queues apolaires des phospholipides. Cette disposition spatiale forme une bicouche avec les têtes polaires vers l'extérieur et les queues apolaires enfouies dans la structure ce qui augmente l'entropie des molécules d'eau environnantes et favorise la stabilité de la structure. Le regroupement de molécules non polaires en solution aqueuse est appelé effet hydrophobe. Figure adaptée du site <https://level8chem.wordpress.com/liquid-crystals/>

Introduction

Une bicouche lipidique est une barrière semi-perméable. Elle est considérée comme totalement imperméable aux ions, aux petites molécules chargées, ainsi qu'aux grandes molécules polaires non chargées, comme le glucose (**Figure 1.3**). Elle est en revanche perméable aux petites molécules polaires non chargées, comme l'eau, aux petites molécules non polaires, comme l'O₂, ou aux molécules liposolubles, comme les hormones stéroïdiennes. Par exemple, le sodium, diffuse à travers une bicouche à une vitesse de l'ordre de 10⁻¹² cm/s. A cette vitesse il traverse une bicouche lipidique de 5nm en 139 heures. Une molécule d'eau traverse la même structure en 50ns, soit 10 milliards de fois plus vite (A. K. McNeil et al. 2006; P. L. McNeil et al. 2000) (Raedler, Strey, et Sackmann 1995).

La perméabilité des bicouches lipidiques est en fait variable et dépend d'un ensemble de conditions :

- La présence de chaînes d'acides gras insaturés provoque un encombrement stérique latéral qui diminue la densité des phospholipides et augmente la perméabilité des bicouches lipidiques (**Figure 1.4**).
- La présence d'autres lipides, comme le cholestérol, diminue la perméabilité en renforçant les interactions latérales entre les phospholipides.
- Certains paramètres physico-chimiques, comme la température ou la force ionique du milieu environnant, influencent grandement la perméabilité. Ainsi, la perméabilité d'une bicouche lipidique augmente avec la température.

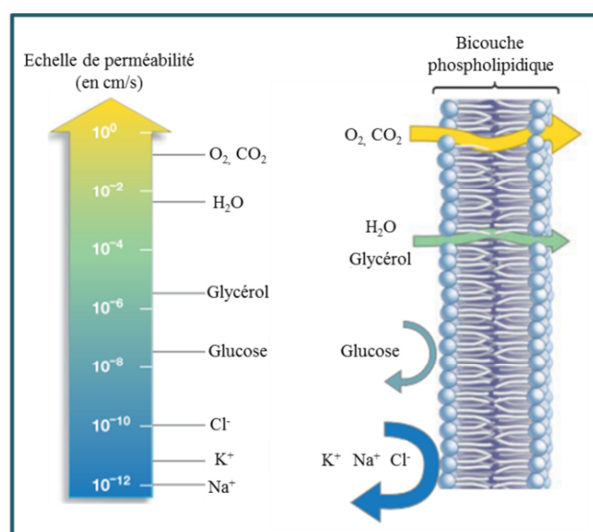


Figure 1.3 : Illustration de la perméabilité d'une bicouche lipidique. Une bicouche lipidique est une barrière semi-perméable. Les deux barrières formées par les têtes polaires s'opposent au passage des ions et des molécules chargées. Les gaz et les petites molécules comme l'eau peuvent traverser une bicouche lipidique. A gauche de la figure, l'échelle de perméabilité donne des ordres de grandeur de vitesse de diffusion à travers une bicouche lipidique en cm/s à 37°C. Les couleurs des flèches pour les ions et molécules correspondent au code couleur de l'échelle. Figure adaptée du site <http://www.pearsoned.ca/highered/showcase/freeman/>

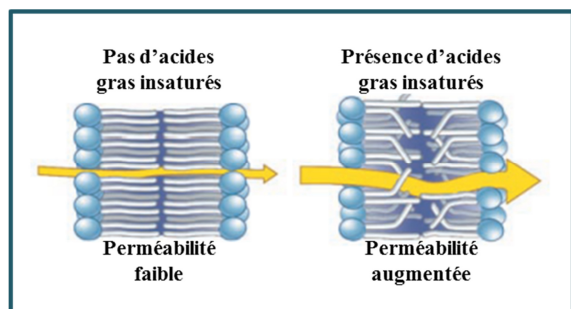


Figure 1.4 : La présence de chaînes d'acides gras cis-insaturés diminue la densité des phospholipides membranaires ce qui augmente la perméabilité d'une bicouche et diminue son point de fusion. Figure adaptée de <http://www.pearsoned.ca/highered/showcase/freeman/>

Introduction

Comme les phospholipides s'auto-associent par des interactions de faible énergie, ils peuvent diffuser passivement au sein de la bicouche. Deux types de mouvement dominant : la rotation des phospholipides sur eux-mêmes et leur diffusion latérale au sein d'un feuillet. La diffusion latérale, dont la vitesse est de l'ordre du $\mu\text{m/s}$, est essentielle aux fonctions assurées par les membranes biologiques (Edidin 2003). Les phospholipides diffusent dans chaque feuillet membranaire de façon indépendante (**Figure 1.5**). Par contre, en raison du coût énergétique associé au déplacement de la tête polaire à travers la région hydrophobe de la bicouche, l'échange passif de phospholipides entre les deux feuillets (ou flip-flop) est un phénomène très rare (moins d'une fois par mois pour une molécule) (Seifert 1997).

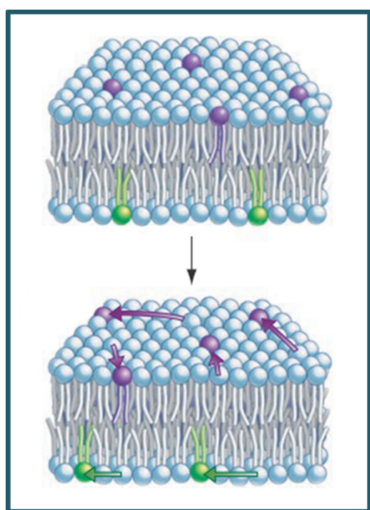


Figure 1.5 : Mouvement des phospholipides au sein des feuillets d'une bicouche lipidique. Dans chaque feuillet d'une bicouche lipidique, les phospholipides diffusent latéralement (flèches) et indépendamment des mouvements dans l'autre feuillet (phospholipides marqués en vert ou phospholipides marqués en violet). Le passage spontané d'un phospholipide d'un feuillet à l'autre dans une bicouche lipidique est un phénomène rare. Figure adaptée de <http://www.pearsoned.ca/highered/showcase/freeman/>

Dans les membranes biologiques des cellules mammaliennes, les quatre glycérophospholipides les plus représentés sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylethanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) (**Figure 1.6**). A pH physiologique, la PC, la PS et la PE sont ionisées, mais seule la PS a une charge nette négative. Deux autres lipides sont très représentés dans les membranes plasmiques de cellules eucaryotes : le cholestérol et les sphingomyélines (**Figure 1.7**). Ces lipides représentent environ 30 à 40% des lipides totaux composant les membranes plasmiques des cellules eucaryotes. Le cholestérol est un membre de la famille des stérols, qui est composé d'une petite queue hydrocarbonée apolaire, d'un cycle stéroïdien formant une structure en anneau rigide et d'un groupement hydroxyle polaire. Le cholestérol s'oriente dans les membranes plasmiques de manière à ce que le groupement hydroxyle soit proche des têtes polaires des phospholipides. Dans cette position, le cycle stéroïdien rigide interagit avec les chaînes hydrocarbonées des phospholipides et ralentit leur diffusion latérale (**Figure 1.7**).

Introduction

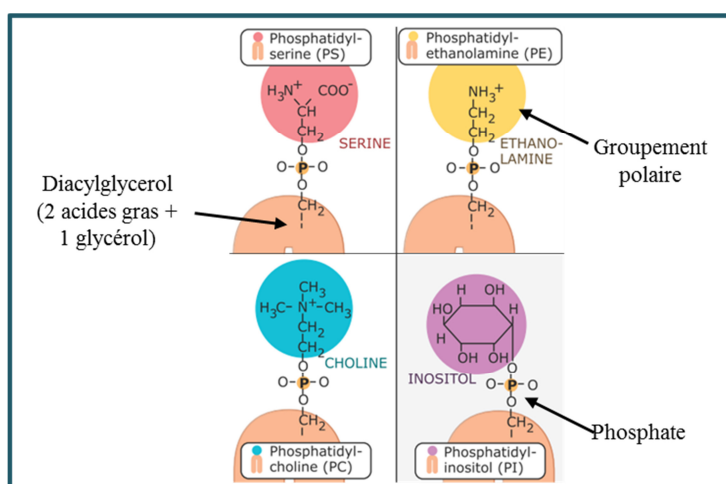


Figure 1.6 : Structure des groupements polaires des quatre glycérophospholipides majeurs retrouvés dans les membranes des cellules mammaliennes. Les glycérophospholipides les plus représentés dans les membranes biologiques sont la PhosphatidylCholine (PC), la PhosphatidylEthanolamine (PE), le PhosphatidylInositol (PI) et la PhosphatidylSérine (PS). La PS et la PE sont qualifiés d'amino-phospholipides car leur tête polaire est dérivée de la sérine et l'éthanolamine, respectivement. Comme montré dans la figure, à pH physiologique le groupement X de la PS, PE et PC sont ionisés. Dans cette condition seule la PS possède une charge nette négative. Figure adaptée de (Plopper 2012).

Cette diminution de la mobilité des phospholipides membranaires rigidifie les membranes plasmiques et diminue leur perméabilité aux petites molécules hydrophiles.

Les sphingomyélines appartiennent à la famille des sphingolipides. Leur structure est très similaire aux glycérophospholipides. Elles sont composées par l'assemblage d'un résidu d'acide gras, d'une sphingosine et d'une tête polaire pouvant être de la choline ou de l'éthanolamine (**Figure 1.7**). Les sphingomyélines possèdent une partie hydrophobe plus saturée que la majorité des glycérophospholipides membranaires (Slotte et Ramstedt 2007) ce qui implique qu'elles ont une forme plus allongée. Dans les membranes plasmiques, elles s'associent préférentiellement avec le cholestérol.

Au sein des membranes biologiques, il existe une asymétrie de composition phospholipidique entre les deux feuillets membranaires. La PS, la PE et le PI se trouvent essentiellement dans le feuillet interne de la membrane plasmique, alors que 80 à 85% des sphingomyélines se situent dans le feuillet externe (Verkley et al. 1973). Cette asymétrie est essentielle à l'initiation et/ou déroulement de nombreux processus associés à la physiologie de la cellule. Par exemple, les Protéine Kinases C (PKC) activées se lient au feuillet interne de la membrane plasmique via les têtes polaires des PS. Les PI sont également le site de liaison de nombreuses kinases activées dans différentes voies de signalisation. Ils constituent aussi un substrat pour plusieurs enzymes, telles que les phospholipases C, qui les clivent en messagers intracellulaires solubles à courte durée de vie.

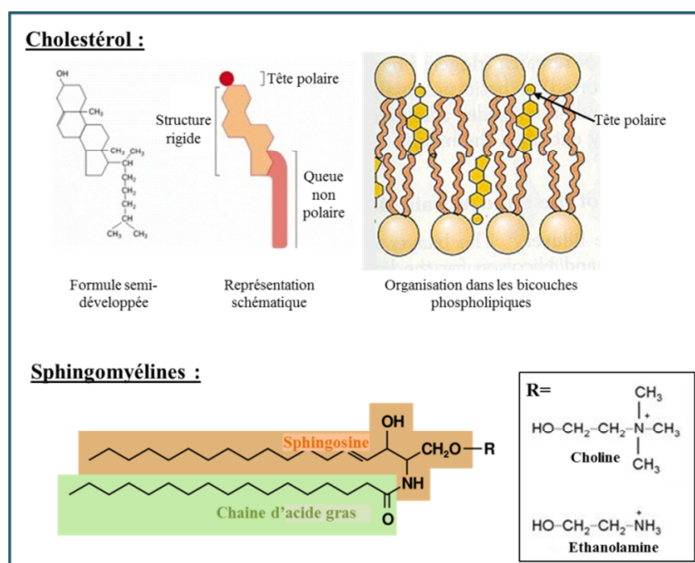


Figure 1.7 : Structure du cholestérol et des sphingomyélines. Le cholestérol est un membre de la famille des stérols. Il s'insère dans les feuillets membranaires de manière à ce que son groupement hydroxyle polaire soit en contact avec les têtes polaires des molécules de phospholipides. Dans cette position le cycle stéroïdien rigide interagit avec les chaînes hydrocarbonées des phospholipides et ralentit leur diffusion latérale. Sa présence diminue la perméabilité des bicouches lipidiques. Les sphingomyélines sont des membres de la famille des sphingolipides. Les lipides de cette famille partagent une structure commune appelée sphingosine (orange). Les sphingomyélines ont une structure générale semblable aux phospholipides avec une queue apolaire constituée d'une chaîne d'acide gras (vert) et la chaîne hydrocarbonée de la sphingosine ainsi qu'une tête polaire composée de la partie polaire de la sphingosine associée à un groupement R qui peut être la choline ou l'éthanolamine (encadré). Les sphingomyélines sont majoritairement présentes dans le feuillet externe de la membrane plasmique où elles représentent environ 30% des lipides. Les sphingomyélines ont une forme plus allongée que la plupart des phospholipides membranaires, cette différence de longueur génère des épaissements de la bicouche lipidique lorsqu'elles sont enrichies dans une région. Figures adaptées de : (Alberts et al. 2002)

L'asymétrie lipidique à plusieurs origines qui dépendent du phospholipide et de la membrane qu'il compose (membrane d'un organe, membrane plasmique,...). Par exemple, la membrane plasmique est synthétisée et assemblée dans le réticulum endoplasmique où les PS et PE ont une répartition équilibrée entre les deux feuillets membranaires. Une fois intégrées à la surface de la cellule, les PS et PE du feuillet externe de la membrane plasmique néo-synthétisée sont transloquées vers le feuillet interne de façon dépendante de l'ATP, par des protéines transporteurs de la sous famille P4 des ATPases de type P (**Figure 1.8**) (van Meer, Voelker, et Feigenson 2008).

Dans certaines conditions, comme la stimulation par des signaux pro-apoptotiques, pro-inflammatoires ou pro-coagulants, les cellules peuvent rompre activement l'asymétrie de répartition de la PS, en exposant les PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Cette exposition permet l'initiation de nombreux processus, comme la reconnaissance des cellules apoptotiques ou nécrotiques par les macrophages ou lymphocytes, ou encore la coagulation sanguine (Henson, Bratton, et Fadok 2001).

Introduction

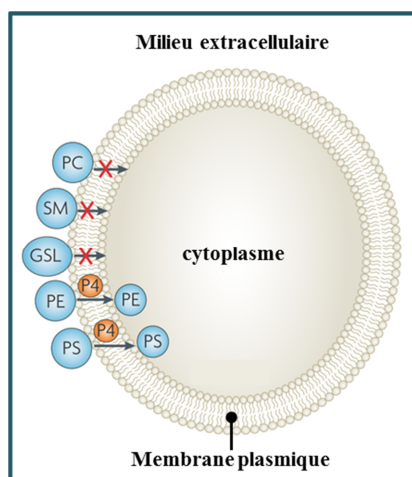


Figure 1.8 : Répartition asymétrique des phospholipides dans la membrane plasmique. L'asymétrie lipidique à plusieurs origines qui dépendent du phospholipide et de la membrane qu'il compose (membrane d'un organe, membrane plasmique,...). La membrane plasmique est synthétisée et assemblée dans le réticulum endoplasmique où les PS et PE ont une répartition équilibrée entre les deux feuillets membranaires. Une fois intégrées à la surface de la cellule, les PS et PE du feuillet externe de la membrane plasmique néo-synthétisée sont transloquées vers le feuillet interne de façon dépendante de l'ATP, par des protéines transporteurs de la sous famille P4 des ATPases de type P. Figure adaptée (van Meer, Voelker, et Feigenson 2008)

Les protéines membranaires sont indispensables aux fonctions physiologiques associées aux membranes biologiques. Ces protéines sont associées aux membranes de plusieurs façons (**Figure 1.9**).

Elles peuvent traverser totalement ou partiellement la bicouche (**Figure 1.9, bleu**). Elles peuvent aussi être associées aux bicouches lipidiques via des interactions non covalentes avec d'autres protéines membranaires (**Figure 1.9, vert**). Elles peuvent enfin être ancrées à un

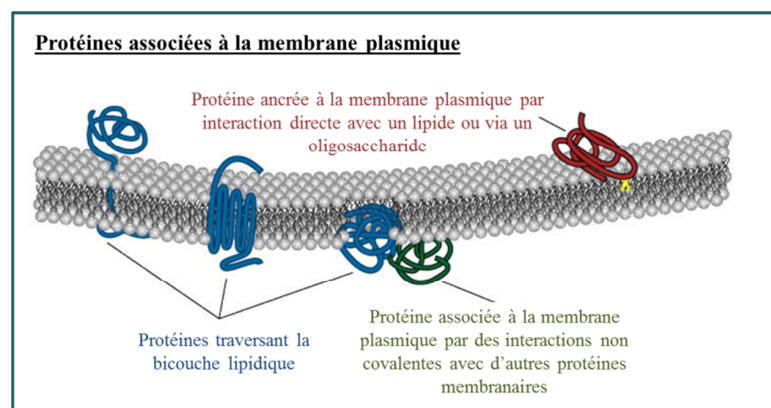


Figure 1.9 : Représentation schématique des différents modes d'association des protéines membranaires avec les bicouches phospholipidiques. Les protéines membranaires représentent environ 50% de la masse de la membrane plasmique. Elles sont indispensables pour les échanges, entre la cellule et son environnement, sous forme de canaux, de pompes, de récepteurs, médiateurs de voies de signalisations. Leur association à la membrane plasmique se fait de différentes façons. Elles peuvent traverser totalement, une ou plusieurs fois, les bicouches par différentes structures secondaires (hélice- α , tonneau- β) ou traverser partiellement les bicouches lipidiques (protéines en bleues). Elles peuvent également s'associer aux bicouches lipidiques par des interactions non covalentes avec d'autres protéines membranaires (protéine en vert). Elles peuvent enfin être ancrées à un feuillet des bicouches par liaison covalente directement avec des lipides du feuillet ou indirectement via des oligosaccharides (protéine en rouge). Figure adaptée du site <https://wikispaces.psu.edu>

feuillet membranaire par liaison covalente, soit directement avec un lipide ou indirectement avec un oligosaccharide (**Figure 1.9, rouge**).

Introduction

La mobilité des protéines membranaires est un phénomène extrêmement important dans le fonctionnement des membranes plasmiques. De nombreuses voies de signalisation sont initiées par le recrutement et la polymérisation de protéines membranaires.

Malgré leur mobilité latérale rapide, les lipides et les protéines membranaires sont répartis de façon hétérogène, se ségrant en domaines dynamiques (Brown et Rose 1992). Ces domaines membranaires, appelés microdomaines ou radeaux lipidiques, sont des plateformes de signalisation essentielles à l'adaptation des cellules eucaryotes à leur environnement. Ce sont de petites régions membranaires, de quelques dizaines de μm^2 , dont la stabilité est due à l'enrichissement en sphingolipides et en cholestérol (**Figure 1.10**). La présence des sphingolipides, plus longs que la plupart des glycérophospholipides, provoque un épaissement de la membrane au niveau des microdomaines, qui permet un ancrage stable de protéines membranaires. Les radeaux lipidiques peuvent ainsi constituer des régions riches en récepteurs, facilitant leur agrégation après activation.

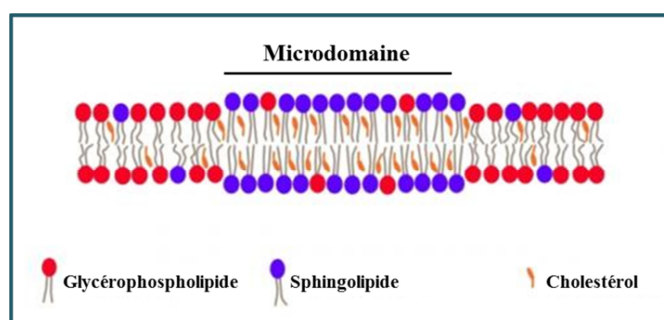


Figure 1.10 : Représentation schématique de la structure d'un radeau lipidique. Les radeaux lipidiques sont des zones de la bicouche lipidique enrichies en sphingolipides et en cholestérol. La présence de sphingolipides, qui sont plus allongés que les phospholipides, provoque un épaissement de la bicouche. L'interaction des sphingolipides avec le cholestérol limite leur diffusion ce qui crée des régions stables. Les microdomaines sont considérés comme des changements de phase de la membrane plasmique et sont des sites d'insertion préférentiels de protéines membranaires. Figure adaptée du site <http://www.microscopy-analysis.com>

Le modèle actuel de la membrane plasmique est un modèle revisité de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicholson (Singer et Nicolson 1972) (**Figure 1.11**). Dans ce modèle, la membrane plasmique est perçue comme un fluide bidimensionnel de phases hétérogènes. Une phase majoritaire contient des molécules dont la diffusion latérale est rapide, aléatoire et indépendante entre les deux feuillets membranaires. L'autre phase contient des régions dispersées, riches en sphingolipides, cholestérol et protéines. Dans cette phase, la diffusion latérale des composants est fortement diminuée, avec une dépendance entre les feuillets membranaires.

Les glucides représentent 15% des composants de la membrane plasmique. Afin de se limiter aux informations essentielles à la compréhension de ce travail de thèse, leur structure et leurs fonctions ne sont pas abordées ici.

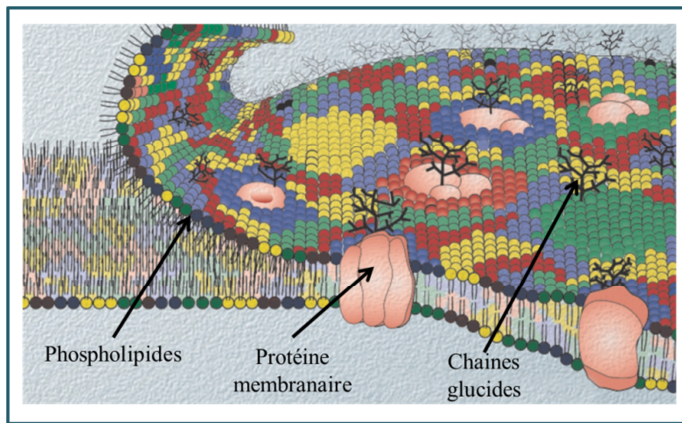


Figure 1.11 : Modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson (1972). La membrane plasmique est perçue comme un fluide bidimensionnel de phases hétérogènes. Une phase majoritaire contient des molécules à diffusion latérale rapide et aléatoire, indépendante entre les 2 feuillets de la membrane. Une phase éparsée est composée de régions organisées, riches en sphingolipides, cholestérol et protéines, dans lesquelles la diffusion latérale des composants est fortement diminuée, avec une dépendance entre les feuillets membranaire. Figure adaptée de (Edidin 2003)

A2. Homéostasie calcique

La bicouche lipidique est une structure imperméable aux ions et aux molécules polaires, comme le glucose, mais relativement perméable aux gaz, à l'eau ainsi qu'aux petites molécules comme le glycérol. La nécessité qu'ont les cellules à échanger avec le milieu extracellulaire, tout en contrôlant les concentrations cytoplasmiques en solutés (**Figure 1.12**), requiert une régulation fine des processus d'import/export à travers la membrane plasmique. La répartition des solutés, de part et d'autre de la bicouche, à des concentrations très différentes génère de gradients électrochimiques dont la résultante est connue sous le terme de potentiel membranaire de repos. Les cellules consacrent beaucoup d'énergie à réguler ces gradients électrochimiques. Elles peuvent, de plus, créer des flux ioniques afin d'induire des changements de potentiel membranaire. Ces changements initient des processus comme la génération d'un potentiel d'action pour la communication nerveuse ou la contraction musculaire. A titre d'exemple, on estime que les neurones et les fibroblastes utilisent 25% de leur production d'ATP pour maintenir leur homéostasie (Lodish et al. 2000). Ces flux ioniques sont essentiellement générés par l'ouverture et la fermeture de canaux et/ou pompes protéiques sensibles à des agents chimiques ou à des changements de potentiel électrique de la membrane plasmique. Le transport d'un ion selon son gradient chimique est appelé transport passif et ne requiert pas de dépense énergétique alors que le transport d'un ion contre son gradient chimique, appelé transport actif, nécessite une dépense énergétique. La perte de l'intégrité structurale de la membrane plasmique conduit à un défaut du contrôle de ces flux et provoque la diffusion des ions dans le sens de leur gradient chimique, jusqu'à équilibre des concentrations (**Figure 1.12**). Les conséquences peuvent être catastrophiques pour la cellule, avec une entrée massive d'ions, comme le Ca^{2+} ou le sodium (Na^+), mais aussi la fuite de métabolites cytoplasmiques chargés négativement, comme l'ATP (**Figure 1.12, A**).

Introduction

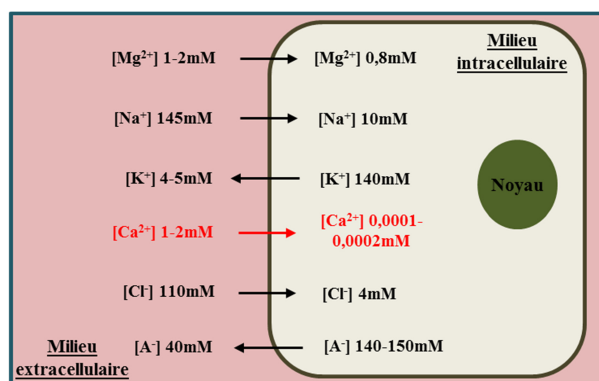


Figure 1.12 : Concentration des principaux ions et molécules chargées de part et d'autre de la membrane plasmique pour les cellules animales. La membrane plasmique est une barrière semi-perméable. Les concentrations ioniques dans la cellule sont finement régulées par la présence de protéines membranaires formant des canaux et des pompes sélectives. Les différences de concentrations ioniques entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire associées aux différences de charges électriques

créées un ensemble de gradients électriques et chimiques (flèches). L'ouverture de canaux, ou pompes, provoque le mouvement des ions, soit selon leur gradient chimique (flèches, transport passif), soit contre leur gradient nécessitant de l'énergie (transport actif). Ainsi, en cas de perte de l'intégrité de la membrane plasmique, le potassium (K^+) et les molécules intracellulaires chargées négativement (A^-) comme les molécules phosphatées (ATP, NADP, etc) ont tendance à sortir de la cellule alors que le chlore (Cl^-), le sodium (Na^+), le magnésium (Mg^{2+}) et le calcium (Ca^{2+}) entrent dans la cellule. Le gradient chimique du Ca^{2+} est très fort, par conséquent, la perte de l'intégrité de la membrane plasmique est suivie de sa diffusion rapide dans le cytoplasme

Le Ca^{2+} est un ion essentiel que ce soit à l'échelle de l'organisme ou de la cellule. Dans l'organisme, c'est le minéral le plus abondant dont 99% sont déposés autour de la trame protéique osseuse sous forme de cristaux d'hydroxyapatite (Vallet et Tack 2012). Il est essentiel à de grandes fonctions physiologiques comme la minéralisation osseuse, la contraction musculaire, la transmission de l'influx nerveux ou la coagulation sanguine. A l'échelle cellulaire, le Ca^{2+} est associé à une multitude de voies de signalisations. Il intervient également dans des fonctions comme la prolifération cellulaire, le trafic vésiculaire et la sécrétion, l'adhésion à la matrice extracellulaire ou la synthèse d'ATP (Berridge, Lipp, et Bootman 2000). Du fait de son implication dans un grand nombre de processus, la régulation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} est un phénomène très dynamique et complexe. Dans la cellule, la quantité totale de Ca^{2+} comprend le Ca^{2+} stocké dans des organites, le Ca^{2+} lié à des protéines et le Ca^{2+} libre cytosolique. L'organite majeur pour le stockage du Ca^{2+} est le réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique, dans le cas du tissu musculaire. De façon plus mineure les mitochondries, les saccules golgiennes, les endosomes/lysosomes et les peroxysomes peuvent aussi participer au stockage du Ca^{2+} . Le Ca^{2+} peut être associé à des protéines engagées dans des voies de signalisation dépendantes du Ca^{2+} ou à des protéines jouant le rôle de tampon, comme la parvalbumine- β ou de la calbindine-D28K. En absence de stimulation, la concentration en Ca^{2+} libre cytosolique est maintenue aux alentours de 100 à 200nM. Après stimulation, du Ca^{2+} extracellulaire peut être importé dans la cellule, par ouverture de canaux membranaires pour augmenter directement la concentration en Ca^{2+} nécessaire à l'activation des effecteurs. Certains seconds messagers peuvent aussi stimuler la libération de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique, selon un processus connu sous le nom de CICR (pour « Calcium-Induced Calcium Release ») (Figure 1.13, encadré rouge). Une partie du Ca^{2+} intracellulaire est alors piégé par des protéines tampons (Figure 1.13, croix

Introduction

violettes). Lorsque la stimulation est terminée, le Ca^{2+} libéré par les effecteurs est, d'une part, pompé par le réticulum endoplasmique ainsi que par les mitochondries et, d'autre part, exporté dans le milieu extracellulaire par des pompes et échangeurs (**Figure 1.13, encadré bleu**). Les protéines tampons peuvent également libérer du Ca^{2+} jusqu'au retour à la concentration de repos. L'homéostasie calcique à l'échelle cellulaire nécessite une coordination parfaite entre les mécanismes médiés par les signaux d'activation et les mécanismes médiés par les signaux de retour à l'état de repos.

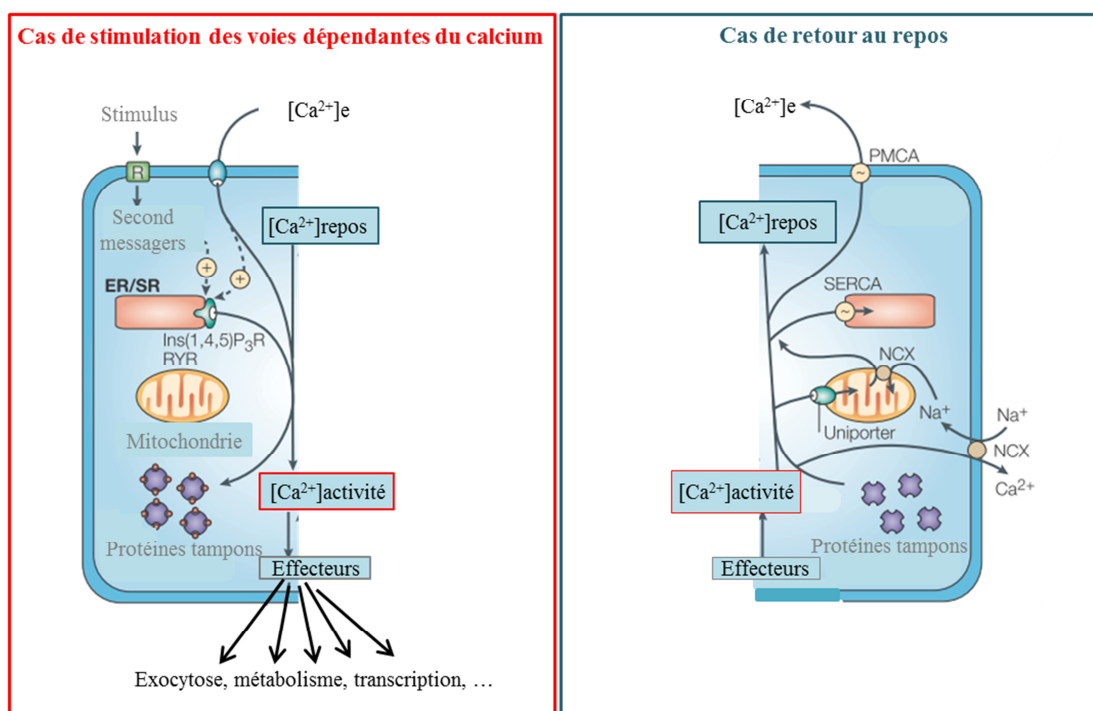


Figure 1.13 : Homéostasie calcique. Un stimulus peut provoquer l'entrée directe de Ca^{2+} , par la membrane plasmique, ou la formation de seconds messagers. Les seconds messagers comme l'inositol-1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P₃) activent des canaux calciques dans la membrane du réticulum endoplasmique (ER), provoquant la sortie de Ca^{2+} du réticulum vers le cytosol. L'équivalent du réticulum endoplasmique dans le muscle strié, le réticulum sarcoplasmique (SR), possède un canal calcique sensible au Ca^{2+} , appelé récepteur à la ryanodine (RYR). Il s'ouvre lorsque la concentration calcique cytosolique est supérieure à la concentration de repos, afin de libérer les ions Ca^{2+} stockés dans le réticulum sarcoplasmique. Les ions Ca^{2+} libérés se lient à des effecteurs (protéines à activité dépendante du Ca^{2+}) et les activent. L'excès de Ca^{2+} intracellulaire libre (petites sphères rouges) se lie à des protéines tampons (croix violettes) qui empêchent la concentration en Ca^{2+} d'augmenter au-delà de son seuil de cytotoxicité. Lorsque les processus cellulaires préalablement activés se terminent (**cas de retour au repos**), le Ca^{2+} quitte les effecteurs et est éliminé par différentes pompes et échangeurs. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) à la membrane plasmique expulse le Ca^{2+} des cellules contre une entrée de Na^+ . La pompe ATPase de la membrane plasmique (PMCA) expulse également le Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire alors que la pompe ATPase de la membrane du réticulum sarco(endo)plasmique (SERCA) pompe le Ca^{2+} cytosolique vers la lumière du réticulum endoplasmique. Les mitochondries ont aussi une fonction active dans le retour à la concentration calcique de repos par l'import rapide de Ca^{2+} via un canal calcique puis une expulsion lente dans le cytosol par un échangeur NCX. Le Ca^{2+} lentement libéré dans le cytosol est alors expulsé de la cellule ou internalisé par le réticulum. Figure adaptée de (Berridge, Bootman, et Roderick 2003)

Le Ca^{2+} libre intracellulaire est maintenu à une concentration environ 10 000 fois plus faible que dans le milieu extracellulaire. Le maintien d'une concentration Ca^{2+} faible dans le cytosol des cellules mammaliennes a deux raisons majeures. Tout d'abord, à forte concentration, le Ca^{2+} a tendance à précipiter le phosphate, qui est une molécule indispensable à la survie des cellules. La seconde raison provient de la cytotoxicité du Ca^{2+} . A forte concentration, le Ca^{2+} intracellulaire peut entraîner une dérégulation de l'asymétrie phospholipidique membranaire, la perméabilisation des mitochondries, l'activation de protéases et d'endonucléases, l'ensemble de ces mécanismes aboutissant à la mort de la cellule par des processus nécrotiques ou apoptotiques (Dong et al. 2006). Dans les myocytes cardiaques, par exemple, l'élévation en Ca^{2+} cytosolique conduit à la nécrose du tissu cardiaque, en cas d'ischémie (Fleckenstein et al. 1974). Les concentrations intracellulaires critiques (limites inférieures et supérieures) en Ca^{2+} intracellulaire libre restent difficilement mesurables. Les cellules épithéliales de rein de lapin peuvent, par exemple, tolérer une concentration calcique de $100\mu\text{M}$ sur une période de 3 heures (Weinberg, Davis, et Venkatachalam 1997). Au-delà, l'excès de Ca^{2+} est létal de façon irréversible. La tolérance au Ca^{2+} pourrait néanmoins dépendre du type cellulaire et du temps d'exposition.

B. Réparation membranaire

La membrane plasmique est une structure de 5nm d'épaisseur environ, dynamique et fluide, formée par un ensemble d'interactions non-covalentes. Directement exposée à l'environnement extracellulaire, elle est régulièrement confrontée à des contraintes mécaniques et chimiques pouvant aboutir à sa rupture. La rupture de la membrane est un phénomène physiologique dans de nombreux tissus en condition normale. Certaines pathologies peuvent augmenter significativement la fréquence des ruptures. Après avoir décrit les différentes observations qui ont mis en évidence ce phénomène, nous dresserons un état des lieux des connaissances sur les mécanismes de réparation de la membrane plasmique.

B1. Mise en évidence de ruptures membranaires physiologiques

La principale approche expérimentale qui a permis de mettre en évidence la présence de ruptures de la membrane plasmique en condition physiologique repose sur l'injection dans des animaux d'un marqueur, incapable de franchir la membrane plasmique (**Figure 1.14**). Après avoir imposé aux animaux une activité, les tissus d'intérêt sont analysés. La présence du marqueur dans le cytoplasme des cellules témoigne de l'existence de ruptures de la membrane plasmique.

En inoculant par voie orale une solution de dextran couplé à la fluorescéine, McNeil et ses collaborateurs ont ainsi observé un marquage intracellulaire fort des cellules épithéliales du tube digestif chez des souris gavées avec une alimentation solide (P. L. McNeil et Ito 1989). Le **Tableau 1** résume les principaux résultats obtenus chez les rongeurs durant la fin des années 1990. Parmi les cellules étudiées, celles qui semblent le plus touchées par les événements de

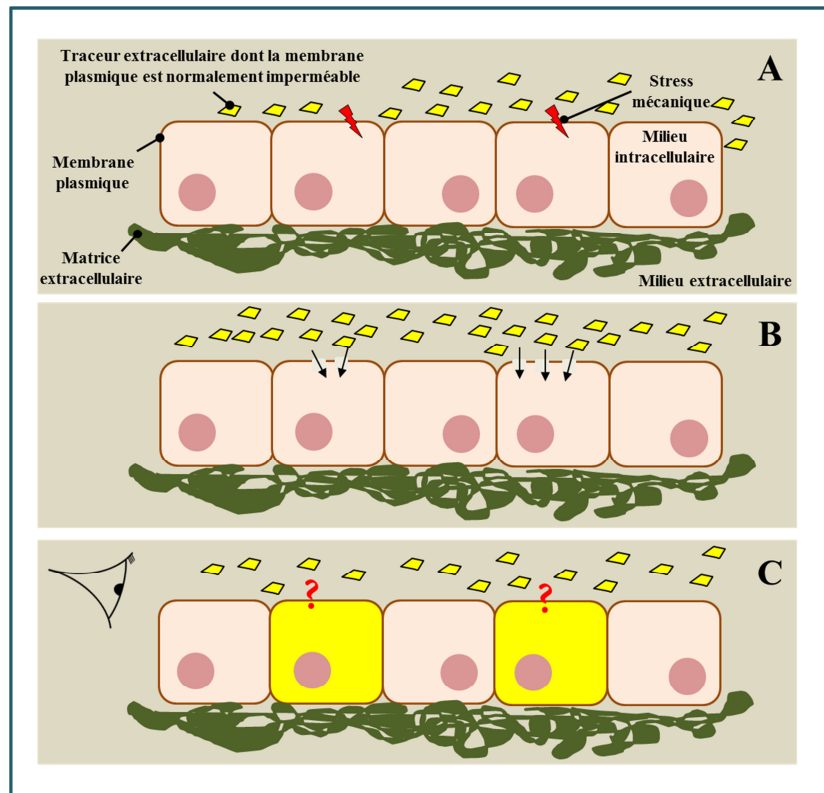


Figure 1.14 : Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour la mise en évidence de ruptures mécaniques de la membrane plasmique en condition physiologique. (A) Dans un premier temps, les cellules d'intérêt sont mises en contact avec un marqueur coloré ou fluorescent, incapable de traverser la membrane plasmique. (B) Les animaux inoculés avec les sondes sont soumis à une activité sollicitant les tissus d'intérêt (activité physique, ingestion d'aliments solides, etc). Si ces activités génèrent des ruptures de la membrane plasmique des cellules, la sonde colorée/fluorescente entre dans les cellules et les marque. (C) L'animal est euthanasié et des sections du tissu d'intérêt sont réalisés puis observés en microscopie.

ruptures de la membrane plasmique sont les fibres musculaires striées squelettiques et les cardiomyocytes. Ainsi pour des rats au repos, 4% des fibres musculaires de triceps sont marquées pour l'albumine sérique (**Figure 1.15, rat témoin**), (P. L. McNeil et Khakee 1992). Lorsque les rats sont soumis à un exercice de course sur un plan incliné, nécessitant des contractions excentriques du tissu musculaire strié squelettique, la proportion de fibres musculaires positives à l'albumine immédiatement après exercice passe à 20% (**Figure 1.15, rat ayant couru sur un plan incliné**).

Les contraintes mécaniques ne sont pas les seules causes de lésion de la membrane plasmique de cellules. La membrane plasmique est aussi une cible préférentielle en cas d'infection ou de réaction inflammatoire. Dans le monde du vivant, un large éventail d'organismes, allant des bactéries aux métazoaires en passant par les plantes, possède des molécules pouvant altérer la perméabilité de la membrane plasmique (Bischofberger, Iacovache, et Gisou van der Goot 2012).

Introduction

Organe/Système d'intérêt	Type cellulaire	Animal modèle	Type de stress	Pourcentage de cellules touchées
Système digestif (P. L. McNeil et Ito 1989)	Cellules épithéliales	souris	Mécanique (forces de frottement)	Non mesuré
Peau (P. L. McNeil et Ito 1990)	Cellules épithéliales	rat	Mécanique (scratch/déplacements) forces de frottement	3% repos 10% activité
Système vasculaire (artère aortique) (Yu et McNeil 1992)	Cellules endothéliales	rat	Mécanique (forces de cisaillement)	6%
Muscle strié squelettique (P. L. McNeil et Khakee 1992)	Fibres musculaires	rat	Contraintes mécaniques liées à la contraction	4% repos 20% activité
Muscle strié cardiaque (Clarke et al. 1995)	Cardiomyocytes	rat	Contraintes mécaniques liées à la contraction	25% rythme cardiaque normal 75% rythme cardiaque rapide

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principales données expérimentales mettant en évidence des ruptures physiologiques de la membrane plasmique. Chez les rongeurs, la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires se rompt en condition physiologique. En condition de repos, la proportion de cellules touchées pour la plupart de ces tissus est inférieure à 10%. Cette proportion peut augmenter d'un facteur 3 à 5 en cas d'activité physique soutenue. Les cellules musculaires striées cardiaques, qui sont continuellement sollicitées, sont les plus touchées par des ruptures de la membrane plasmique.

Les protéines formant des pores font partie de cette famille de molécules. Ces protéines sont le plus souvent produites sous forme monomérique et s'assemblent en complexes oligomériques qui s'insèrent dans la membrane pour former des pores. Parmi ces protéines, les toxines bactériennes formant des pores (PFTs pour « pore-forming toxins ») sont les plus étudiées et décrites dans la littérature. A titre d'exemple, 115 des 325 toxines bactériennes, identifiées au début des années 2000, étaient des PTFs (Alouf 2001). Les bactéries produisent ces PFTs pour tuer d'autres bactéries. Par exemple, certaines souches d'*E.coli* produisent des colicines pour la colonisation d'une niche écologique (Cascales et al. 2007)). D'autres bactéries pathogènes produisent des PFTs pour faciliter leur expansion et survie dans leur hôte. La perméabilisation de la membrane plasmique peut permettre aux bactéries de détruire directement des cellules cibles par dérégulation de l'homéostasie ou, indirectement, par le passage d'effecteurs cytotoxiques à travers les pores. Elle leur permet également d'accéder au cytosol pour échapper aux cellules et molécules du système immunitaire de l'hôte. Les cellules du système immunitaire de nombreux organismes produisent également des protéines formant des pores pour éliminer des pathogènes, des cellules infectées ou encore des cellules présentant des molécules du soi altérées, comme les cellules apoptotiques ou cancéreuses. Les protéines formant des pores immunitaires les mieux décrites sont la perforine et le composant n°9 du système du complément. Ces protéines dans le cas de maladies auto-immunes, de maladies avec un état inflammatoire chronique ou autres pathologies impliquant un recrutement et une activité intensive des cellules du système immunitaire, peuvent affecter des

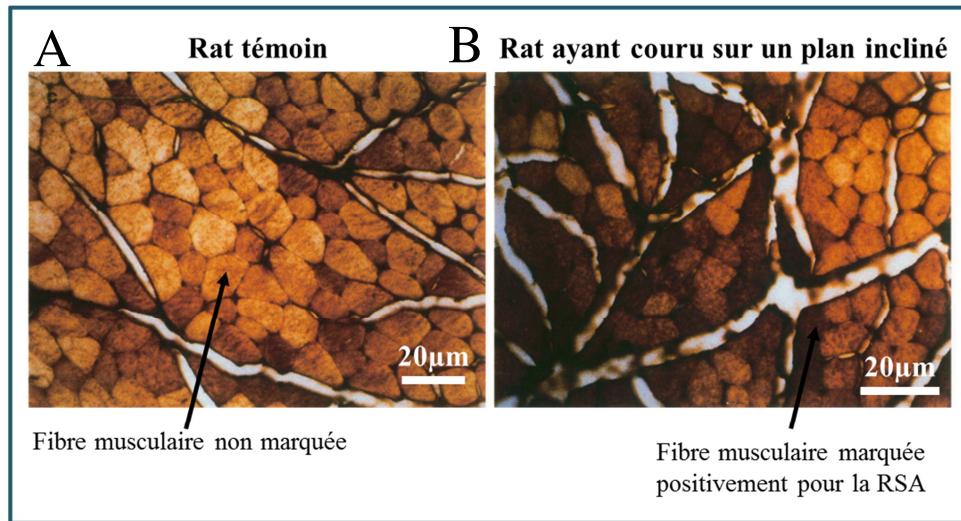


Figure 1.15 : Micrographies de coupes transversales de triceps de rat après marquage de l'albumine sérique (RSA) en immunohistochimie. Les rats témoins (A) ont été laissés dans leur cage sans aucune contrainte imposée durant les expériences tandis que les rats testés (B) ont couru sur un plan incliné durant l'expérience. Les rats témoins et testés ont été ensuite euthanasiés et des coupes transversales de leurs triceps ont été réalisées. Les coupes ont été marquées en immunohistochimie pour l'albumine. Les fibres musculaires contenant de l'albumine apparaissent marrons voire noires après révélation des complexes anticorps-albumine. Les images montrent une différence importante entre la proportion de cellules positives et l'intensité de leur marquage pour les rats ayant couru et les rats témoins. Figure adaptée de (P. L. McNeil et Khakee 1992)

cellules du soi. Ainsi le système du complément a été décrit comme étant le principal contributeur des dommages tissulaires survenant après un épisode d'ischémie-reperfusion (Arumugam et al. 2002). En plus des contraintes mécaniques, les cellules d'un organisme doivent donc aussi faire face à la perforation «biologique» de leur membrane plasmique.

B2. Les mécanismes de réparation de la membrane plasmique actuellement proposés

En 1917, par une étude sur des oocytes d'oursin endommagés à l'aide d'une aiguille, Robert Chambers décrivait : « la guérison d'une cellule lésée suscite la formation d'un film qui prévient l'extension de la lésion, ...en résumé la couche de surface est une structure sous forme de gel visqueux hautement extensible, contractile, capable d'une réparation constante » (Chambers 1917). Bien des années plus tard, Paul McNeil et ses collaborateurs ont aussi rapporté l'existence de mécanismes de réparation membranaire *in vivo*. Ils ont ainsi observé que 20% des fibres musculaires de rat sont touchées par des ruptures membranaires immédiatement après un exercice physique (P. L. McNeil et Khakee 1992) . Cette proportion chute d'un facteur 4 lorsque l'analyse est réalisée après 24h de repos, indiquant que les fibres musculaires lésées ont progressivement éliminé l'albumine intracellulaire accumulée pendant l'exercice physique, tout en rétablissant l'intégrité de leur membrane plasmique. Quel que soit le type de dommage membranaire, il a été montré que le Ca^{2+} , à une concentration de l'ordre du mM, est indispensable pour initier le phénomène de réparation (« The Dynamics of Living

Protoplasm - ScienceDirect » 2015) (« Explorations into the Nature of the Living Cell. : Academic Medicine » 2015) (B. P. Morgan et Campbell 1985). Plusieurs mécanismes de réparation sont aujourd'hui proposés.

B2.a. Réparation spontanée de la bicouche lipidique ou modèle du « self-sealing »

Pour des ruptures de très petite taille ($<1\mu\text{m}$), les liposomes (Paul L. McNeil et Steinhardt 2003) et les globules rouges (Hoffman 1992), cellules dépourvues d'organites, sont capables de réparer spontanément leur membrane plasmique selon un mécanisme passif Ca^{2+} -indépendant, appelé « self-sealing ». Dans ce modèle, la rupture de la membrane plasmique entraîne l'exposition de la partie hydrophobe de la membrane plasmique à l'environnement aqueux (**Figure 1.16b**). L'interaction des domaines hydrophobes des phospholipides avec l'eau étant thermodynamiquement défavorable, une réorganisation de la bicouche lipidique au site de rupture s'opère de manière à minimiser ces interactions (**Figure 1.16c**).

La réorientation des phospholipides entraîne une instabilité de la bicouche lipidique, appelée tension de surface, qui favorise le rapprochement des extrémités membranaires réorganisées et par conséquent, le colmatage de la rupture. Dans les cellules nucléées, la présence d'un cytosquelette cortical associé aux protéines membranaires crée une tension sur la membrane plasmique (Diz-Muñoz, Fletcher, et Weiner 2013) s'opposant au « self-sealing » (**Figure 1.17**). Il a également été observé que l'application d'une tension membranaire artificielle sur des liposomes à l'aide d'une micropipette compromet la réparation de ruptures submicrométriques (Zhelev et Needham 1993).

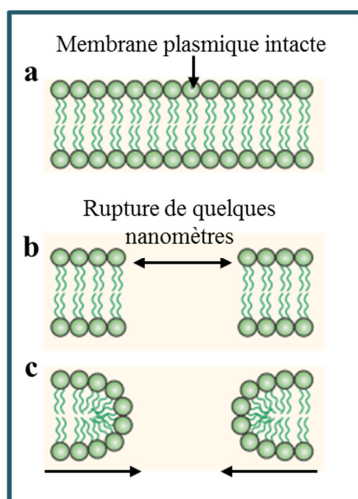


Figure 1.16 : Modèle de réparation membranaire du self-sealing. Lorsque la membrane intacte (a) est endommagée avec une taille de lésion submicrométrique (b), les queues hydrophobes des phospholipides qui bordent le site de rupture sont exposées aux molécules d'eau. L'exposition des queues hydrophobes aux molécules d'eau est un coût énergétique, qui déstabilise la bicouche lipidique et provoque la réorganisation et réorientation des phospholipides au niveau du site de rupture de manière à limiter la surface de contact avec l'eau (c). Le désordre des phospholipides, au niveau du site de rupture, provoque le rapprochement spatial des têtes polaires de part et d'autre de la rupture. Ce rapprochement est suffisant pour induire la réparation spontanée de la rupture. Figure tirée de (Paul L. McNeil et Kirchhausen 2005).

Il est pourtant admis que les cellules sont capables de survivre à des ruptures de plus de $10\mu\text{m}$ (Paul L. McNeil et Kirchhausen 2005). Le modèle du « self-sealing » ne suffit donc pas pour expliquer comment la plupart des ruptures macroscopiques sont rapidement réparées *in vivo*. D'autres mécanismes actifs et Ca^{2+} -dépendants ont depuis été décrits.

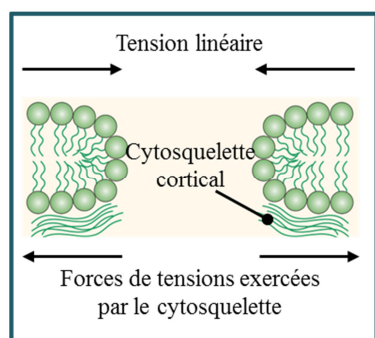


Figure 1.17 : Schéma simplifié représentant les principales forces mises en jeu après rupture mécanique de la membrane. La membrane plasmique des cellules eucaryotes est bordée par un cytosquelette cortical avec lequel elle est liée. Le cytosquelette par son remodelage dynamique, exerce sur la membrane plasmique une tension constante. Lorsque la membrane plasmique est rompue les forces de tensions du cytosquelette s'opposent à la réparation membranaire spontanée (self-sealing). Figure tirée de (Paul L. McNeil et Kirchhausen 2005)

B2.b. Modèle de réduction de la tension membranaire de surface par exocytose

Le Ca^{2+} , à une concentration de l'ordre du mM, permet d'initier la réparation membranaire. Le Mg^{2+} , également à une concentration de l'ordre du mM, agit comme un antagoniste du Ca^{2+} et inhibe les mécanismes de réparation (Steinhardt, Bi, et Alderton 1994). Cet effet antagoniste du Mg^{2+} pour un mécanisme dépendant du Ca^{2+} est similaire aux processus se mettant en place lors de la sécrétion synaptique (Hutter et Kostial 1954) ou lors des processus d'exocytose pour les cellules non sécrétoires. Il a également été observé que l'inhibition de protéines impliquées dans différentes étapes de l'exocytose comme la CaM-Kinase, la kinésine ou encore la synaptobrevine-2, diminue la capacité de réparation membranaire des cellules (Steinhardt, Bi, et Alderton 1994). Parallèlement, il a été montré que l'ajout de surfactant ou d'inhibiteur de la synthèse d'actine permet de restaurer la réparation membranaire même lorsque l'exocytose est bloquée (Togo et al. 1999). L'inhibition de la synthèse d'actine ou l'insertion du surfactant dans la membrane plasmique conduisent à une réduction de la tension de surface de la membrane plasmique. L'ensemble de ces données suggère que la réparation membranaire requiert un processus d'exocytose Ca^{2+} -dépendant permettant une diminution de la tension de surface au niveau de la zone membranaire endommagée.

Dans ce modèle actif, la rupture de la membrane plasmique conduit à une élévation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (**Figure 1.18a**). Cette élévation de la concentration en Ca^{2+} initie le recrutement de vésicules à proximité de la zone de rupture et leur fusion à la membrane par un processus similaire à l'exocytose (**Figure 1.18b**). Le remodelage du cytosquelette cortical pour l'accession des vésicules d'exocytose à la membrane plasmique, ainsi que l'apport de matériel membranaire diminue la tension de surface de la membrane plasmique permettant aux extrémités membranaires lésées de se rapprocher et de fusionner, comme dans le modèle du self-sealing (**Figure 1.18c**).

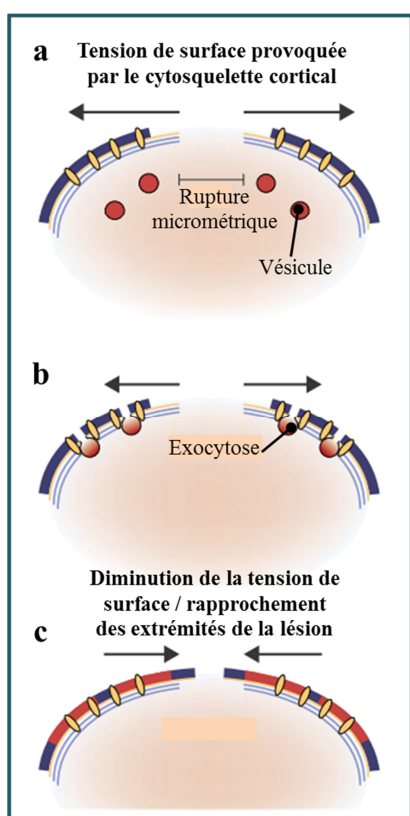


Figure 1.18 : Modèle de réduction de la tension de surface par exocytose. Dans le modèle de la réduction de tension de surface par exocytose, la rupture de la membrane plasmique est suivie d'une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule lésée (a). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire active des mécanismes d'exocytose. La fusion de vésicules d'exocytose à la membrane plasmique (b) conduit à un remodelage du cytosquelette cortical pour l'accès des vésicules d'exocytose à la membrane plasmique. De plus il apporte du matériel lipidique supplémentaire après fusion (c). Ces deux phénomènes réduisent la tension membranaire et rapprochent les phospholipides bordant la rupture ce qui provoque leur fusion spontanée. Figure adaptée de (P. L. McNeil et Terasaki 2001).

La mécanistique exacte de la réduction de la tension de surface reste à éclaircir. Elle pourrait faire intervenir le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2). Le PIP2 régule l'adhésion entre la membrane plasmique et le cytosquelette cortical (Raucher et Sheetz 2000). L'exocytose de vésicules sécrétoires pourrait modifier la concentration membranaire en PIP2 à proximité de la rupture, déstabiliser localement l'interaction entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique et permettre ainsi de faciliter la fermeture de la rupture.

Les cellules eucaryotes, comme les oocytes d'oursin, peuvent survivre à l'ablation de fragments de membrane d'une taille considérable (400 à $>1000\mu\text{m}^2$) et réparer les dommages membranaires en quelques secondes (Terasaki, Miyake, et McNeil 1997). La réparation membranaire implique, dans ce cas, un colmatage rapide de la zone endommagée. Le modèle de réduction de la tension de surface peut difficilement satisfaire à cette contrainte. Des modèles alternatifs ont été proposés.

B2.c. Modèle du « patch » lipidique

Dans des oocytes d'oursin, il a été montré qu'un traceur fluorescent, injecté à l'aide d'une micropipette, reste séquestré dans une zone, riche en membrane, de $5\mu\text{m}$ de largeur autour de la pointe de la pipette (Terasaki, Miyake, et McNeil 1997). La même expérience réalisée en absence de Ca^{2+} a, de plus, montré que le traceur injecté diffuse dans toute la cellule. Pour des cellules endothéliales de la rétine de bœuf, il a été observé que l'ablation de morceaux de membrane est suivie en quelques secondes par la formation d'un réseau très dense de

vésicules intracellulaires au niveau de la zone de rupture (Miyake et McNeil 1995). Ces observations, parmi d'autres, ont suggéré un modèle de réparation, nommé par Paul McNeil : modèle du « patch » lipidique. Dans ce modèle, la rupture de la membrane plasmique est suivie d'une entrée massive de Ca^{2+} extracellulaire (**Figure 1.19a**). L'augmentation de la concentration locale en Ca^{2+} libre initie le recrutement de vésicules intracellulaires (**Figure 1.19b**) qui fusionnent pour former un agrégat ou « patch » lipidique (**Figure 1.19c**) à proximité de la membrane lésée. La fusion du patch vésiculaire avec la membrane plasmique permet de colmater la rupture (**Figure 1.19d**).

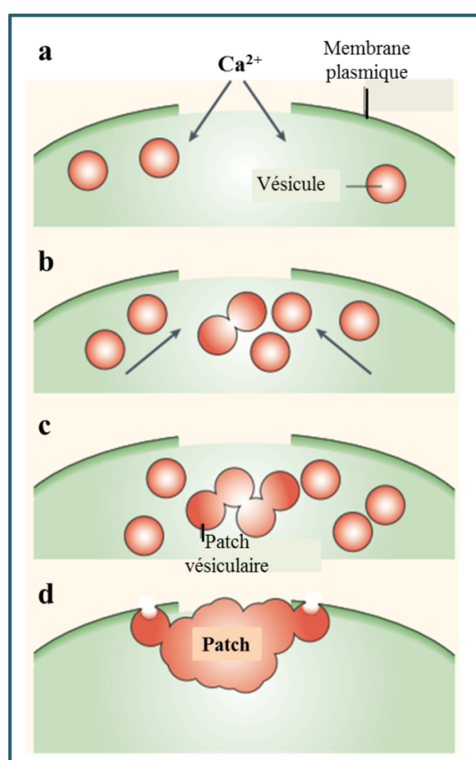


Figure 1.19 : Modèle de réparation du « patch » lipidique.

Dans le modèle du « patch » lipidique la rupture micrométrique de la membrane plasmique est suivie d'une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule lésée (a). L'augmentation locale de la concentration calcique intracellulaire initie le recrutement de vésicules intracellulaires (b) et leur fusion pour former un agrégat vésiculaire ou « patch » (c). Le patch fusionne au niveau de la zone de rupture et bouche la lésion ce qui empêche l'entrée de Ca^{2+} ou la fuite de métabolites comme l'ATP (d). Figure adaptée de (Paul L. McNeil et Kirchhausen 2005)

La nature des vésicules intracellulaires participant à la formation du « patch » lipidique fait encore débat aujourd'hui. Pour les oocytes d'oursin, les auteurs ont mis en évidence que le « patch » se formait selon une fusion homotypique à partir d'organelles appelées *Yolk granules* (P. L. McNeil et al. 2000). C'est probablement le seul cas connu de fusion homotypique. Dans les cellules endothéliales de la rétine de bœuf, les vésicules intracellulaires fusionnant lors de la formation du « patch » serait d'origine endosomale-lysosomale (Miyake et McNeil 1995). Une étude sur le champignon *Neurospora crassa* a montré l'implication d'organelles, appelées corps de Woronin, similaires aux peroxysomes dans la réparation membranaire (Jedd et Chua 2000). D'autres études sur des fibroblastes de rat (Reddy, Caler, et Andrews 2001) ou de souris modèle (Chakrabarti et al. 2003) ont mis en évidence l'intervention des lysosomes.

Il est probable, dans des conditions de stress intense lié à une macrorupture de la membrane plasmique, que la formation du « patch » implique l'ensemble des vésicules intracellulaires, disponibles à proximité de la rupture, indépendamment de leur nature.

Le modèle du patch n'invalide pas le modèle de la réduction de tension de surface mais permet de donner une explication alternative sur la manière dont les cellules survivent aux ruptures macroscopiques avec ablation de régions de plusieurs centaines voire milliers de μm^2 . La membrane du patch pourrait servir seulement de barrière temporaire, qui serait ensuite progressivement éliminée pour que la membrane plasmique retrouve sa composition et sa structure originelle.

La fusion du patch lipidique, au niveau du site de rupture, s'explique difficilement selon un mode classique de fusion par expansion radiale d'un seul pore de fusion. En effet, la fusion d'un agrégat lipidique, d'une taille aussi importante, à partir d'un point d'accrochage unique compromettrait la continuité de la membrane néo-formée autour du site de rupture. Un modèle théorique, appelé modèle du vertex-fusion, a été proposé pour résoudre ce problème.

B2.d. Modèle du vertex-fusion

Le modèle classique de fusion entre deux vésicules repose sur la formation d'une zone de contact entre deux membranes (**Figure 1.20**). Au niveau de la zone contact, la création d'un pore unique provoque le mélange des contenus des deux vésicules ou bien la libération du contenu d'une vésicule dans le milieu extracellulaire dans le cas de la fusion d'une vésicule à la membrane plasmique. L'expansion radiale du pore entraîne la fusion complète des vésicules et donne naissance à une vésicule de taille plus importante, aucun matériel lipidique n'étant éliminé.

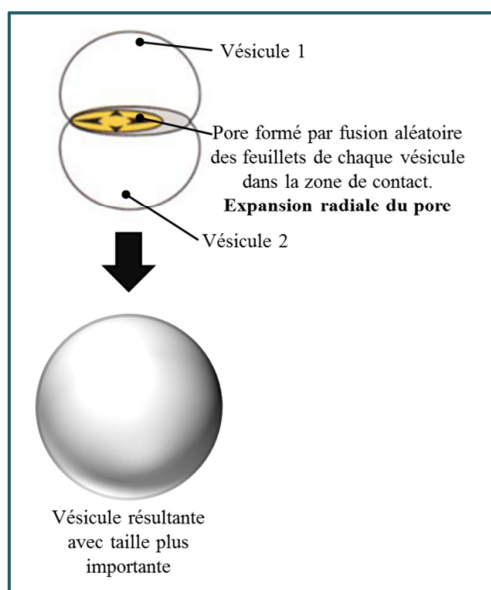


Figure 1.20 : Modèle classique de fusion par expansion radiale d'un pore de fusion. Dans le modèle classique de fusion entre deux membranes lipidiques (représentées ici par deux vésicules), la mise en contact des membranes adjacentes provoque le mélange local des deux bicouches aboutissant à la formation d'un pore. L'expansion du pore permet la fusion complète des deux bicouches lipidiques et, dans le cas de deux vésicules, la formation d'une vésicule unique ayant une taille plus importante que les deux vésicules qui ont fusionnés (L. Wang et al. 2002).

En géométrie, le vertex est le point où se réunissent deux segments de lignes, il correspond, par exemple, aux sommets d'un polygone. Le modèle du vertex-fusion a été développé à partir d'études sur la fusion de vacuoles chez l'organisme *Saccharomyces cerevisiae* (L. Wang et al. 2002). Chez cette levure, la fusion des vacuoles impose le contact entre trois domaines distincts (**Figure 1.21**). Un premier domaine correspond aux régions membranaires à l'opposé des régions de contact (**Figure 1.21, O**). Un second domaine correspond à la zone de contact entre les vésicules apposées (**Figure 1.21, B**). La dernière région correspond aux zones qui sont à la fois à proximité de la région de contact et à proximité de la région hors de contact et constituent les vertices ou vertex (**Figure 1.21, V**).

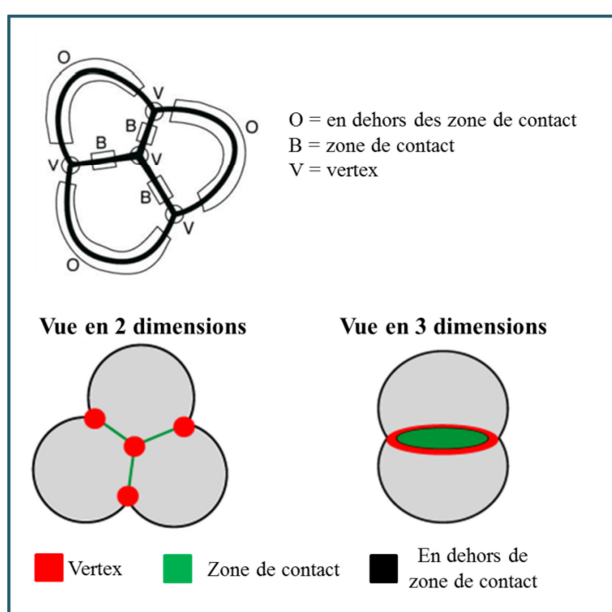


Figure 1.21 : Schéma illustrant les différentes régions membranaires créées par le contact entre plusieurs vésicules. Dans le modèle de fusion de plusieurs vésicules avec formation de vertices, le contact entre vésicules implique la formation de 3 domaines distincts. Un premier domaine correspond aux régions membranaires à l'opposé de la région de contact (**O**). Un second domaine correspond à la zone de contact entre les vésicules, il est composé des deux membranes apposées (**B**). La dernière région correspond aux zones qui sont à la fois à proximité de la région de contact et à proximité de la région hors de contact (**V**). Les régions vertex ou vertices sont des zones privilégiées de fusion, car enrichies en protéines fusogéniques. Figure adaptée de (Fratti et al. 2004) et (L. Wang et al. 2003).

Les régions vertex sont enrichies en protéines de fusion et en phospholipides spécifiques (diacylglycérol, phosphoinositides et ergostérol) favorisant la fusion membranaire (L. Wang et al. 2002) (Fratti et al. 2004). Il n'est pas encore clair si le processus de vertex-fusion se réalise à partir de la formation continue de multiples pores, jusqu'à obtention d'une zone de fusion continue, ou par propagation latérale progressive de vertex pré-existants, selon un mode de type « fermeture éclair » (**Figure 1.22**). Dans tous les cas, la fusion par les vertices entraîne l'élimination d'une partie de la zone de contact membranaire.

Dans le modèle du vertex-fusion, le « patch » lipidique, formé par l'élévation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (**Figure 1.23, a et b**), se lie à la zone endommagée via un ensemble de vertices (**Figure 1.23c**). La fusion des vertices forme une région continue autour de la zone de rupture (**Figure 1.23d**).

Introduction

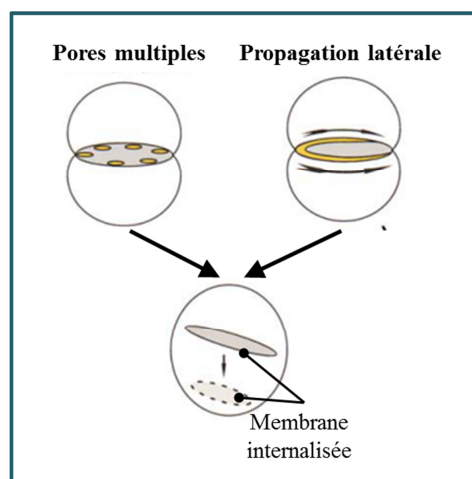


Figure 1.22 : Schéma illustrant les hypothèses de fusion entre vésicules selon le modèle du vertex. La fusion de vésicules selon le modèle du vertex pourrait se faire de deux manières : soit par formation de pores multiples au niveau des vertices, jusqu'à l'obtention d'une zone de fusion continue (pores multiples), soit par propagation latérale, comme dans un système de fermeture éclair. Dans les deux cas, la fusion par les vertices entraîne l'élimination de membrane correspondant à la zone de contact. Figure adaptée de (L. Wang et al. 2002).

La zone membranaire endommagée est éliminée, provoquant l'apparition d'un domaine concave à la surface de la cellule (**Figure 1.23e**). La diffusion latérale des lipides et protéines, provenant de régions éloignées de la zone endommagée, au sein de la membrane plasmique néo-formée permet de restaurer la membrane plasmique (**Figure 1.23f**). Le modèle du vertex-fusion reste, néanmoins, un modèle très hypothétique. Aucun homologue des protéines de fusion présentes chez la levure n'a, par exemple, été identifié à ce jour.

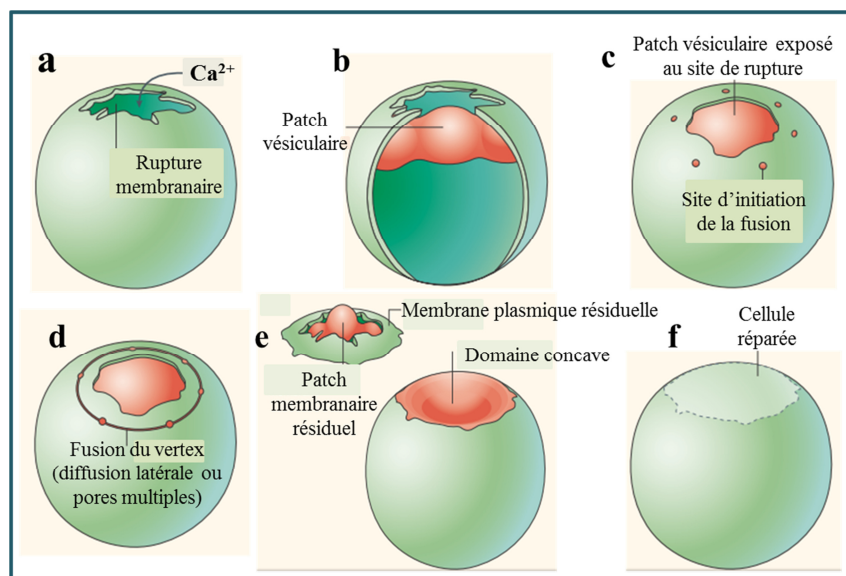


Figure 1.23 : Réparation membranaire selon le modèle du vertex-fusion. Dans le modèle du vertex-fusion, la rupture de la membrane plasmique est suivie d'une entrée massive de Ca^{2+} extracellulaire (**a**). L'élévation locale de la concentration en Ca^{2+} libre intracellulaire initie le recrutement de vésicules au site de rupture et leur fusion pour former un « patch » lipidique (**b**). La liaison du « patch » au niveau du site de rupture se réalise au niveau des vertices (**c**). La fusion des vertices forme une région continue autour de la zone de rupture (**d**). Cette région est éliminée de la cellule et provoque l'apparition d'un domaine concave à la surface de la cellule (**e**). La diffusion latérale des lipides et protéines au sein de la membrane plasmique néo-formée restaure une membrane plasmique de structure et composition homogène (**Figure 1.21f**). Figure adaptée de (Paul L. McNeil et Kirchhausen 2005)

B2.e. Modèles de réparation pour les membranes endommagées par des PFTs

La réponse des cellules à l'exposition de PFTs est variable. Elle dépend de la quantité et de la nature des toxines, ainsi que du temps d'exposition (Bischofberger, Iacovache, et Gisou van der Goot 2012). Il a ainsi été observé que plusieurs heures sont requises pour qu'une cellule répare la perforation de sa membrane par la toxine α de *Staphylococcus aureus*, qui forme des pores d'environ 2nm de diamètre environ (Husmann et al. 2009), alors que les perforations engendrées par la streptolysine-O (SLO) d'un diamètre d'environ 40nm, sont réparés en moins de 20 minutes (Potez et al. 2011). Cette différence s'explique par le fait que les pores de 2nm créés par la toxine α de *Staphylococcus aureus* sont imperméables aux ions Ca^{2+} (Walev et al. 1993). Cet exemple démontre une nouvelle fois le rôle crucial joué par le Ca^{2+} dans les mécanismes de réparation membranaire, quel que soit le type de dommage. Il démontre également que des mécanismes indépendants de la présence de Ca^{2+} existent. Des mécanismes de réparation membranaire, indépendants du Ca^{2+} , ont d'ailleurs également été décrits chez le nématode *C.elegans* infecté par les toxines Cry5B de *Bacillus thuringiensis* ou VCC de *Vibrio cholerae* (Los et al. 2011).

B2.e1-Modèle du bourgeonnement membranaire :

Les cellules nucléées tumorales d'ascites murines (Goldberg et Green 1959) comme les polymorphonucléaires neutrophiles humains (B. P. Morgan, Dankert, et Esser 1987) sont capables de maintenir l'intégrité de leur membrane plasmique même après une exposition prolongée au complément. Pour les polymorphonucléaires neutrophiles, il a été observé que l'activation de la cascade du complément par des protéases conduit à l'émission de vésicules en quelques minutes (B. P. Morgan 1989). Ils ont estimé que 65% des complexes étaient éliminés par bourgeonnement, avec une perte de seulement 2% de la surface membranaire totale des cellules.

Ce phénomène d'élimination des pores membranaires par émissions de vésicules a aussi été observé pour des fibroblastes et kératinocytes humains (Walev et al. 1995) ainsi que de cellules embryonnaires rénales (E. B. Babiychuk et al. 2009), endommagés par la SLO. Le mécanisme de réparation associé, repose sur la formation d'un bourgeon membranaire, provoquée par l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire dans la cellule perméabilisée (**Figure 1.24**). Il implique des protéines dépendantes du Ca^{2+} comme les Anx (E. B. Babiychuk et al. 2009) et les protéines adaptatrices du complexe ESCRT, comme ALG-2, ou d'autres protéines du complexe ESCRT indépendantes du Ca^{2+} (Scheffer et al. 2014). Ces protéines participent à la fermeture du bourgeon, qui contient les pores, et facilite son élimination par libération dans le milieu extracellulaire (**Figure 1.24c**).

Les mécanismes à l'origine de la formation des bourgeons membranaires restent mal connus. Ils pourraient faire intervenir les sphingomyélinases neutres (SMN) qui hydrolysent le pool de sphingomyélines insérées dans le feuillet interne de la membrane plasmique. L'hydrolyse par les SMN de la tête polaire des sphingomyélines conduit à la formation de céramides. Les céramides sont une classe de sphingolipides composés d'une base structurale sphingosine à

Introduction

laquelle est attaché un acide gras à longue chaîne (C16-C24) sur son groupement amine. Les céramides ont deux origines : une voie de synthèse anabolique dite *de novo* qui a lieu dans le réticulum endoplasmique et une voie de synthèse catabolique dans laquelle ils sont produits par hydrolyse des sphingomyélines contenues dans la membrane plasmique (Hannun et Obeid 2008). Il a été montré que la formation de domaines membranaires riches en céramide sur le feuillet interne d'un liposome provoque le bourgeonnement de la membrane (Holopainen, Angelova, et Kinnunen 2000).

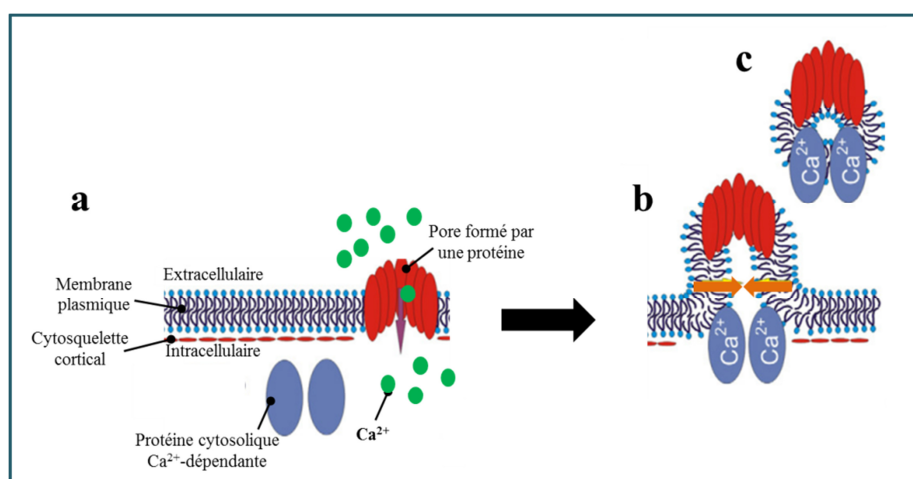


Figure 1.24 : Modèle de réparation par bourgeonnement membranaire. La formation d'un pore par l'insertion d'une protéine formant des pores dans la membrane plasmique d'une cellule cible provoque l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule perméabilisée (a). L'élévation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire libre provoque le bourgeonnement de la membrane autour des pores et active des protéines dépendantes du Ca^{2+} comme les Anx et les protéines adaptatrices du complexe ESCRT comme ALG-2 ou indépendamment du Ca^{2+} les protéines du complexe ESCRT (b). Ces protéines participent à la fermeture du bourgeon. La fermeture du bourgeon membranaire contenant la ou les toxines permet d'arrêter l'entrée incontrôlée de Ca^{2+} extracellulaire et facilite son élimination par libération dans le milieu extracellulaire (c). Figure adaptée de (Draeger, Monastyrskaya, et Babiychuk 2011)

Le bourgeonnement membranaire prendrait naissance suite à l'hydrolyse des résidus phosphorylcholine des sphingomyélines conduisant à la formation de céramides sur ce feuillet interne. La géométrie particulière des céramides provoquerait le « tassement » local des lipides et la courbure de la membrane. La formation de bourgeons membranaires, dépendante de l'activité des SMN, a ainsi été observée pour des granulocytes exposés à la SLO (Walev et al. 2000). Elle a également été observée pour les cellules de la lignée HEK293 qui, après bourgeonnement, émettent des microparticules contenant la SLO ainsi que l'AnxA1 (Eduard B. Babiychuk, Monastyrskaya, et Draeger 2008), (E. B. Babiychuk et al. 2009). Or, l'affinité de l'AnxA1 pour les membranes biologiques est augmentée lorsque ces membranes sont enrichies en céramides. La proportion de sphingomyélines présentes sur le feuillet interne, en condition physiologique, est très faible et probablement insuffisante pour induire l'initiation du bourgeonnement membranaire. Dans des conditions de stress liés à la perforation de la

membrane plasmique, il est possible qu'une partie des sphingomyélines du feuillet externe soit activement transloquée vers le feuillet interne.

Lors de leurs travaux sur les polymorphonucléaires neutrophiles humains (B. P. Morgan, Dankert, et Esser 1987), Morgan et ses collaborateurs ont observé que si 65% des complexes d'attaque membranaire étaient éliminés par bourgeonnement, les 35% restant avaient été internalisés par endocytose (B. P. Morgan, Dankert, et Esser 1987).

B2.e2-Modèle de réparation par endocytose :

Le traitement des fibroblastes NRK avec la SLO est suivi de la formation d'une quantité importante d'endosomes, en comparaison à des cellules non traitées, dès la première minute après traitement (Corrotte et al. 2012). La formation de ces endosomes est suivie de la formation de corps multivésiculaires et de la dégradation de la SLO endocytée dans les 30 minutes suivant l'incubation des cellules avec la SLO. La dégradation de la SLO est inhibée par un traitement préalable des cellules avec des inhibiteurs de l'activité lysosomale mais pas avec des inhibiteurs du protéasome. Il a également été observé que le traitement à la SLO en présence de Ca^{2+} , induit l'exocytose lysosomale, immédiatement suivie de processus d'endocytose, dans des fibroblastes NRK (Tam et al. 2010). Dans ce cas, les cellules NRK endommagées libèrent dans l'espace extracellulaire des sphingomyélinases acides (SMA). Les SMA, comme les SMN, hydrolysent la tête polaire des sphingomyélines et induisent la production de céramides. Dans les cellules eucaryotes, les SMA sont stockées dans les lysosomes, elles ne sont donc pas disponibles pour l'hydrolyse des sphingomyélines du feuillet interne de la membrane plasmique. Leur libération, par sécrétion lysosomale, engendre l'hydrolyse des sphingomyélines présentes sur le feuillet externe. Il a été observée pour des liposomes, que la formation de domaines membranaires riches en céramide sur le feuillet externe provoque une invagination de la membrane (Holopainen, Angelova, et Kinnunen 2000). De plus, l'exposition de cellules des lignées J774 et TRVb-1 à des sphingomyélinases bactériennes induit la formation d'invaginations membranaires (Zha et al. 1998). La présence de domaines riches en céramides dans la membrane plasmique de cellules de mammifères exposées à des stress (irradiations aux UV, infections virales, incubations avec des bactéries) a également été observé (Eduard B. Babiychuk, Monastyrskaya, et Draeger 2008) (Draeger et Babiychuk 2013). Enfin, il a été montré que les PFTs insérées dans la membrane plasmique des fibroblastes de rat NRK sont éliminées par endocytose de façon dépendante de l'ATP (Idone et al. 2008). L'ensemble de ces résultats ont conduit à proposer que l'insertion de PFTs dans la membrane plasmique provoque une entrée de Ca^{2+} dans la cellule (**Figure 1.25**). Cette augmentation de la concentration calcique est suivie de l'exocytose de vésicules lysosomales, libérant dans l'espace extracellulaire des SMA. En hydrolysant les sphingomyélines du feuillet externe de la membrane plasmique, à proximité du site de lésion, les SMA entraînent une courbure de la membrane et initie l'endocytose des PFTs. La membrane plasmique retrouve ainsi son intégrité originelle.

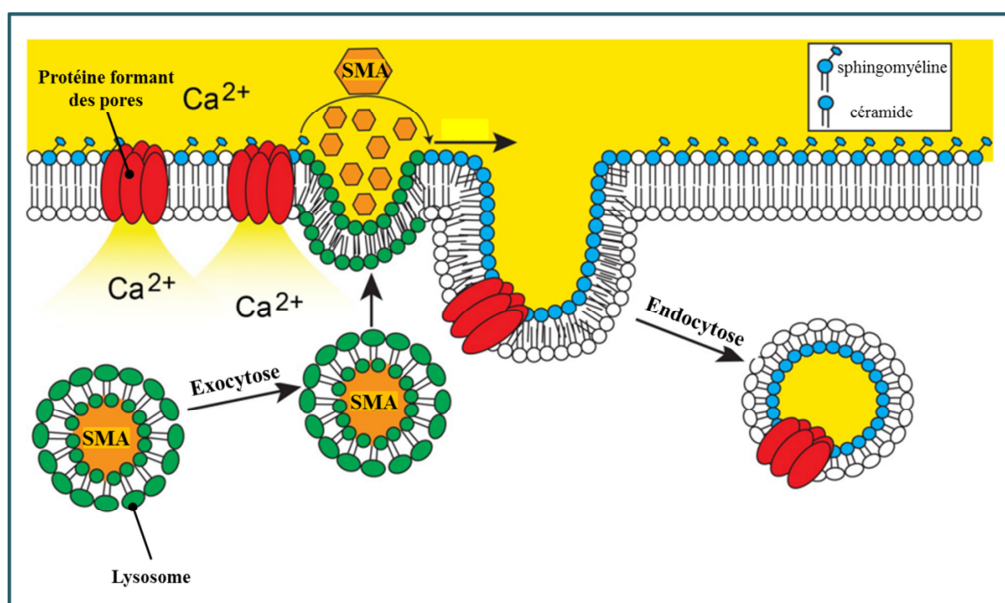


Figure 1.25 : Modèle de l'endocytose par exocytose de sphingomyélinases acides (SMA). Dans ce modèle l'augmentation de la concentration calcique après la formation de pores protéiques dans la membrane plasmique entraîne le recrutement de vésicules lysosomales libérant dans le milieu extracellulaire des SMA activées. Les SMA dégradent les sphingomyélines du feuillet externe de la membrane plasmique, en céramides et entraînent une incurvation de la membrane lésée de manière indépendante de l'ATP qui initie l'endocytose des complexes protéiques insérés dans la membrane plasmique. Figure adaptée de (Tam et al. 2010).

L'élaboration des mécanismes modèles de réparation membranaire repose majoritairement sur des études *in vitro*. La réalité physiologique dans ce domaine reste difficilement accessible. Il est possible que plusieurs mécanismes puissent se mettre en place simultanément, en fonction du type de dommage et du type cellulaire. Il a ainsi été montré que les domaines enrichis en cholestérol, sphingomyélines et céramides sont également riches en protéines de la famille des SNARE, qui ont une forte activité fusogénique (Draeger et Babiychuk 2013). Ces protéines SNARE ont directement été impliquées dans l'étape de fusion de vésicules à la membrane plasmique après lésion (Steinhardt, Bi, et Alderton 1994). Dans le cas de rupture mécanique, la réparation membranaire pourrait donc s'appuyer à la fois sur la sécrétion de SMA lysosomale et la formation d'un « patch » lipidique, favorisée par le recrutement de protéines à activité fusogénique à proximité du site de rupture. D'autre part, de nombreuses études ont suggéré que les processus d'endocytose et de bourgeonnement membranaire pourraient faciliter la restauration de la membrane plasmique au niveau du site de rupture, après colmatage par le « patch » lipidique. Des études *in vivo* sur le nématode *C.elegans* ont également montré que l'infection des cellules épithéliales par la toxine- α de *S.aureus*, par les toxines Cry5B de *Bacillus thuringiensis* ou VCC de *Vibrio cholerae* entraîne à la fois un bourgeonnement membranaire et l'endocytose par ces cellules. (Los et al. 2011) (Husmann et al. 2009).

A l'échelle de l'organisme, la communication intercellulaire, de type juxtacrine, paracrine ou endocrine, pourrait également jouer un rôle crucial dans la réponse aux stress endommageant l'intégrité membranaire. La libération de SMA dans le milieu extracellulaire pourrait ainsi constituer un signal paracrine qui mettrait les cellules voisines dans un état de vigilance.

B3. La machinerie protéique de réparation de la membrane plasmique

L'ensemble des mécanismes de réparation proposés repose sur des remaniements de la structure membranaire, qui requièrent l'intervention d'une machinerie protéique. Du fait qu'un défaut de réparation du sarcolemme de fibres musculaires soit associé au développement de certaines dystrophies (Bansal et al. 2003), la majorité des études dans le domaine a été réalisée sur le tissu musculaire. Par conséquent, plusieurs protéines, identifiées comme appartenant à la machinerie protéique de réparation, sont spécifiques de ce tissu. Leur équivalent dans les autres tissus reste à découvrir. Dans cette partie nous allons décrire les protéines qui ont été impliquées dans le phénomène de réparation membranaire et le rôle qui leur a été assigné dans les différents modèles de réparation.

B3.a. Les protéines à activité Ca^{2+} -indépendante

B3.a1-Les protéines du cytosquelette :

Les cellules peuvent être perçues comme un ensemble de citernes délimitées par des membranes fluides. Pour que cet ensemble soit structuré, maintienne sa forme, résiste aux déformations, sonde et échange, il dispose d'un réseau protéique, dynamique et interconnecté, appelé cytosquelette. La plupart des cellules eucaryotes ont en commun trois types principales de structures protéiques sous forme de polymères. Les microtubules sont de longs cylindres creux fabriqués à partir de monomères de tubulines. Ils assurent le transport intracellulaire et maintiennent la position des différentes organelles. Les filaments intermédiaires sont des assemblages de sous-unités fibreuses allongées maintenues entre elles par un grand nombre de contacts latéraux qui leur confèrent une résistance à l'étirement et aux courbures. Les filaments intermédiaires donnent aux cellules et aux tissus une résistance mécanique. Enfin, les filaments d'actine, ou microfilaments, sont des polymères hélicoïdaux à deux brins de monomères d'actine. L'actine est une des protéines les mieux conservées dans le vivant. Des études phylogénétiques ont montré, par exemple, que les séquences des isoformes humaines et végétales partagent 70-75% d'homologie (Hightower et Meagher 1986). Les microfilaments d'actine sont des structures souples, organisées en faisceaux linéaires, réseaux bidimensionnels et gels tridimensionnels. Ils déterminent la forme de la surface cellulaire et sont nécessaires pour le déplacement des cellules. Les microfilaments d'actine sont capables de polymériser et dépolymériser rapidement, par un processus actif dépendant de l'ATP et de protéines régulatrices (Pollard et Cooper 2009).

Pour assurer les échanges vésiculaires entre les organelles, les cellules possèdent des protéines motrices associées aux réseaux du cytosquelette. Parmi ces protéines, les myosines et les

kinésines sont des ATPases qui utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long des filaments d'actine et des microtubules, respectivement. L'ensemble du réseau cytosquelettique permet le maintien de la forme des cellules et l'intégrité structurale des tissus. La stabilité des épithéliums est ainsi assurée par des interactions intercellulaires au niveau de régions, comme les jonctions d'ancrage ou les jonctions serrées, ainsi que des interactions avec la matrice extracellulaire, via les points d'adhésions focaux ou les hémidesmosomes. L'ensemble des structures du cytosquelette peuvent interagir avec la membrane plasmique, soit par contact direct avec des protéines transmembranaires comme l'actine et les formines de classe 1 (Cvrckova 2013), soit par association avec des protéines adaptatrices reliées à des protéines transmembranaires de type intégrine. Dans le cas des fibres musculaires striées squelettiques, le cytosquelette d'actine est relié aux lamines de la matrice extracellulaire, par l'intermédiaire de complexes glycoprotéiques associés à la dystrophine (Blake et al. 2002) mais aussi par des intégrines.

Bien qu'ils soient répartis dans toute la cellule, les filaments d'actine se concentrent principalement dans la région corticale, où ils établissent de nombreux contacts avec la membrane plasmique. Le réseau cortical d'actine intervient dans une multitude de fonctions comme le maintien de la forme des cellules, la migration, la phagocytose, la protection contre les chocs osmotiques (Rivero et al. 1996) ou encore l'exocytose (Gutiérrez 2012). L'actine corticale, parce qu'elle est en remodelage continu et en association étroite avec la membrane plasmique, exerce sur cette dernière une tension constante. Lors de la migration des cellules, cette tension permet notamment la formation de lamellipodes (Yamaguchi et Condeelis 2007). La déformation membranaire et la migration des cellules sont engendrées par des forces produites par la polymérisation de l'actine-F et son interaction avec les chaînes de myosines (non musculaires). Dans ce cas, le mécanisme d'interaction entre l'actine-F et les myosines diffère de celui décrit pour la contraction des fibres musculaires. Il est régulé par la phosphorylation d'une chaîne légère de myosine appelée chaîne régulatrice, catalysée par la « myosin light-chain kinase ». Cette dernière est activée par la calmoduline dont l'activation est dépendante du Ca^{2+} . L'élévation de la concentration en Ca^{2+} régule donc indirectement la contraction permettant le mouvement de la cellule (« Actin, Myosin, and Cell Movement - The Cell - NCBI Bookshelf » 2015).

L'état de polymérisation de l'actine a un effet sur la réparation membranaire de ruptures mécaniques de la membrane plasmique. Le traitement par des agents bloquant la polymérisation de l'actine, de cellules épithéliales de la muqueuse gastrique de rat (Miyake et al. 2001) et de fibroblastes murins (Togo et al. 1999) améliore l'efficacité de réparation de la membrane plasmique. Au contraire, l'utilisation d'agents stabilisateurs de l'actine-F, comme la phalloïdine ou le jasplakinolide, inhibe la réparation membranaire (Miyake et al. 2001). L'ensemble des expériences, réalisées avec des inhibiteurs ou des stabilisateurs de la polymérisation de l'actine, tend à indiquer que la dépolymérisation de l'actine corticale favorise la fusion des vésicules intracellulaires à la membrane plasmique lésée et promeut ainsi sa réparation (Cooper et McNeil 2015). De nombreuses études, sur des neurones et cellules endocrines, ont mis en évidence que le trafic des vésicules sécrétoires est ralenti dans la région corticale et que leurs mouvements, dans cette zone corticale, sont restreints à des

espaces dépendant de l'état de polymérisation de l'actine (Gutiérrez 2012). Il est aussi admis que le cytosquelette cortical d'actine peut limiter la diffusion brownienne de protéines transmembranaires en formant une barrière physique, qui bloque la partie cytosolique de ces protéines (« Cortical actin networks induce spatio-temporal confinement of phospholipids in the plasma membrane – a minimally invasive investigation by STED-FCS : Scientific Reports » 2015) (Jaqaman et Grinstein 2012) (Gowrishankar et al. 2012). Il est possible que la dépolymérisation locale du cytosquelette, au niveau du site de rupture, permette de faciliter le recrutement de protéines membranaires impliquées dans la réparation.

Le cytosquelette, et les protéines qui lui sont associées, pourraient également jouer un rôle de promoteurs de la réparation membranaire. Il a été observé que l'inhibition de l'activité de la kinésine dans des fibroblastes inhibe le processus de réparation membranaire (Steinhardt, Bi, et Alderton 1994). La kinésine jouerait un rôle dans le transport antérograde de vésicules cytoplasmiques au site de rupture de la membrane plasmique.

Dans les oocytes d'oursin endommagés, il a été montré que les premières vésicules utilisées sont localisées à proximité du site de rupture, probablement amarrées au cytosquelette cortical (Bi et al. 1997). Dans les secondes suivantes, des vésicules situées dans une zone en dehors de la région corticale sont recrutées par l'intermédiaire des myosines. Au-delà de cette période, les vésicules recrutées pour la réparation membranaire sont des vésicules éloignées de la membrane plasmique, dont l'acheminement requiert l'intervention de la kinésine. Le cytosquelette semble donc jouer un rôle actif dans les différentes étapes de la réparation membranaire. Un rôle direct des protéines du cytosquelette dans la réparation membranaire a également été montré pour des oocytes de Xénope (Bement, Mandato, et Kirsch 1999) et des embryons de *Drosophila melanogaster* (Abreu-Blanco, Verboon, et Parkhurst 2011). Pour les oocytes de Xénope endommagés le site de rupture est rapidement encerclé d'un anneau de myosine II non musculaire, elle-même confinée dans un anneau plus large d'actine. Cet anneau d'acto-myosine, entouré par un réseau de microtubules et de microfilaments, permet la fermeture de la rupture, de façon Ca^{2+} -dépendante. Au contraire l'inhibition de la formation du réseau de microtubules ou de l'assemblage du double disque d'acto-myosine empêche la réparation. De même, pour les embryons de drosophile, dont la membrane plasmique a été lésée par irradiation laser, il a été observé une accumulation rapide au site de rupture d'un disque d'actine et de myosine, dont la contraction permet de refermer progressivement la rupture.

La description des fonctions associées au cytosquelette dans la réparation membranaire doit également prendre en compte le phénomène de mécano-transduction. Il est maintenant admis que les cellules ne perçoivent pas uniquement les effecteurs chimiques de leur environnement, mais également les signaux mécaniques qui s'appliquent sur elles (Jaalouk et Lammerding 2009). Dans les cellules tumorales, le potentiel invasif est en partie déterminé par la rigidité du substrat sur lequel elles reposent (Jaalouk et Lammerding 2009). Les cellules tumorales humaines du cancer du sein MDA-MB-231 deviennent plus invasives sur un substrat dense et riche en vitronectine et fibronectine (Bartsch, Staren, et Appert 2003). Un modèle biomécanique du fonctionnement du cytosquelette, emprunté à l'architecture et appelé modèle de tenségrité a été proposé (D E Ingber, Madri, et Jamieson 1981). La tenségrité est la

contraction des termes « tens » pour tension et « grité » pour intégrité. En architecture, les systèmes en tensegrité sont des systèmes réticulés, constitués dans l'espace d'éléments quasi-rigides, isolés et comprimés par un réseau continu d'éléments élastiques en tension. L'application d'une force en un point d'un système en tensegrité ne repose pas sur une réponse locale mais nécessite un réarrangement global de la structure. Dans le modèle de tensegrité, la cellule n'est plus perçue comme un gel entouré d'une membrane visqueuse et maintenue par des structures dynamiques rigides, répondant localement à des perturbations physiques, mais comme un ensemble dynamique dans un état d'équilibre permanent (Donald E. Ingber 2003a) (Donald E. Ingber 2003b). Le cytosquelette s'adapte en permanence en fonction des forces de compression des microtubules, de la tension des microfilaments, des forces d'attachement aux supports ainsi que des forces exercées sur la membrane plasmique. La rupture de cet état d'équilibre, suite à un dommage de la membrane plasmique, pourrait potentiellement jouer le rôle de médiateur mécanique et déclencher des voies de signalisation participant à la réparation membranaire. Ces voies de signalisation mécano-chimiques (« Cytoskeletal Mechanics | Biological Physics and Soft Matter Physics | Cambridge University Press » 2015), qui restent à établir pour la réparation membranaire, pourraient expliquer la réponse adaptative des cellules aux différents types de dommage membranaire.

B3.a2-Les SNAREs :

Deux membranes cellulaires juxtaposées ne peuvent fusionner spontanément. En effet, les bicouches lipidiques sont résistantes aux changements structuraux et déformations, du fait de la somme des interactions faibles, de type hydrophobe, qui lient les queues apolaires entre elles. De plus, la présence de charges au niveau des têtes polaires entraîne l'apparition de forces de répulsion lorsque deux membranes se rapprochent. Enfin, l'encombrement stérique associé à la présence de protéines membranaires empêche le rapprochement des feuillettes externes de deux membranes. La distance maximale à laquelle peuvent se rapprocher deux membranes biologiques distinctes est de l'ordre de 10 à 20nm (Chernomordik et Kozlov 2003). Le phénomène de fusion membranaire dans les cellules eucaryotes nécessite donc l'intervention d'une machinerie protéique spécialisée.

La superfamille des SNARE (pour « Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Attachment protein REceptor ») est composée de plusieurs familles de protéines qui interagissent pour former la machinerie nécessaire à la fusion des vésicules. Initialement les SNAREs étaient classifiées en deux groupes, en fonction de leur localisation subcellulaire. Les vSNAREs sont localisées à la surface des vésicules et les tSNAREs sont situées à la surface des membranes cibles (t pour « target »). Cependant, il a été mis en évidence que des SNAREs pouvaient être présentes à la fois sur les membranes cibles et sur les membranes des vésicules (WanJin Hong et Lev 2014). Les SNAREs jouent un rôle majeur dans l'exocytose des vésicules synaptiques. De nombreux homologues, présents à la surface d'autres types de vésicules, dans des cellules sécrétrices ou non, ont suggéré leur rôle universel dans la fusion membranaire. Les trois principales familles composant la superfamille des SNAREs sont :

- la famille des syntaxines

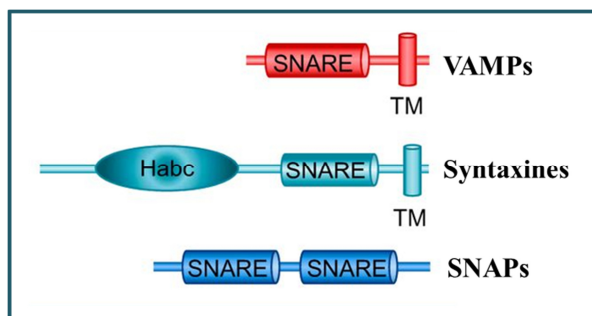


Figure 1.26 : Représentation schématisée des trois familles de protéines formant la superfamille des SNAREs. Les protéines de la famille des SNAREs contiennent au moins un motif caractéristique appelé domaine SNARE. Il est composé d'une structure en hélice- α de 60-70 acides aminés et contenant 8 répétitions de 7 acides aminés. La plupart des SNAREs possède dans leur partie C-Terminale un domaine transmembranaire (TM). Les protéines SNAREs n'ayant pas de domaine transmembranaire sont associées aux membranes via des modifications

lipidiques. Chez les eucaryotes, la fusion de deux bicouches nécessite la formation d'un complexe SNARE. Un complexe SNARE est formé par l'association de deux protéines SNARE sur la membrane cible (généralement une syntaxine et une SNAP) avec une protéine SNARE à la surface des vésicules (généralement une VAMP). L'association entre les différentes protéines SNAREs se fait essentiellement via les domaines SNAREs qui s'enroulent les uns avec les autres, sous forme de structures en spirales. Figure adaptée de (Cooper et McNeil 2015).

- les SNAPs (Soluble N-ethylmaleimide Attachment Proteins)
- les VAMPs (Vesicle Associated Membrane Proteins)

Les SNAREs contiennent au moins un motif caractéristique appelé domaine SNARE (**Figure 1.26**) composé d'une structure en hélice- α de 60-70 acides aminés et contenant 8 répétitions de 7 acides aminés.

La plupart des SNAREs possèdent dans leur partie C-Terminale un domaine transmembranaire. Cependant, 7 des 38 protéines SNAREs actuellement identifiées chez les mammifères, n'ont pas de domaine transmembranaire et sont associées aux membranes via des modifications lipidiques (Wanjin Hong 2005). Les SNAREs ont une origine évolutive ancienne puisqu'elles sont retrouvées à la fois chez les protozoaires, les cellules du règne animal et chez les mycètes. Chez les eucaryotes, la fusion de deux bicouches nécessite la formation d'un complexe SNARE (**Figure 1.27**).

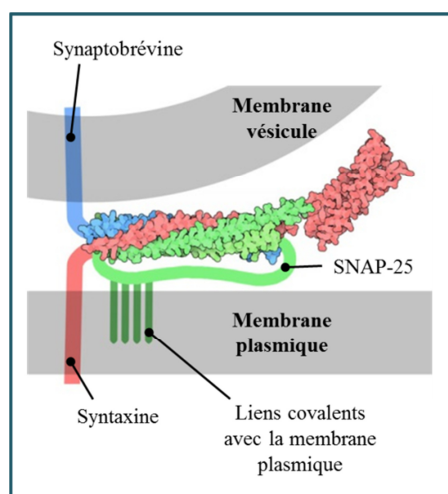


Figure 1.27 : Représentation schématisée d'un complexe ternaire formé par les protéines SNAREs. La fusion des vésicules dépend de l'association des protéines SNARE à leur surface. Lorsque les protéines SNARE sur chaque membrane entrent en contact, elles s'enroulent pour former un complexe ternaire. Ce complexe rapproche de manière stable les deux membranes avant leur fusion. Le complexe montré ici correspond au complexe identifié pour la fusion des vésicules synaptiques dans les neurones. A la membrane des vésicules, la synaptobrevine (en bleu) s'enroule en pelote avec la syntaxine et la protéine SNAP-25 ancrées dans la membrane plasmique.

Figure adaptée de <http://www.rcsb.org/pdb/101/>

Un complexe SNARE est formé par l'association de deux protéines sur la membrane cible, généralement une syntaxine et une SNAP, avec une autre protéine SNARE à la surface des vésicules, généralement une VAMP. L'association entre les différentes protéines SNAREs se fait essentiellement par les domaines SNAREs qui s'enroulent les uns avec les autres, sous forme de structures en spirales. Ces complexes ternaires sont très résistants. Ils résistent à la chaleur et à la lyse par des détergents. Ils permettent ainsi de maintenir les membranes à proximité pour la fusion.

Steinhardt et ses collaborateurs ont montré que l'injection de neurotoxines produites par *Clostridium botulinum*, qui clivent les VAMPs ou SNAP25, inhibe la réparation membranaire des oocytes d'oursins et des fibroblastes murins (Steinhardt, Bi, et Alderton 1994). D'autres expériences, impliquant notamment l'utilisation d'anticorps inhibiteurs des syntaxines, ont confirmé l'implication de ces protéines pour la fusion des vésicules lors du processus de réparation (Togo et al. 1999),(Detrait et al. 2000).

B3.a3-Les complexes ESCRT :

Le recyclage des protéines et récepteurs membranaires dépend d'un tri qui se fait dans les endosomes précoces. La maturation des endosomes précoces se produit par la formation de corps multivésiculaires. Ces corps se déplacent dans le cytoplasme via le réseau de microtubules, et se transforment graduellement en endosomes tardifs en fusionnant les uns avec les autres. La maturation en lysosomes est réalisée par l'apport de protéines issues du réseau trans-golgien. La digestion complète des protéines membranaires, et notamment de leur partie cytosolique, nécessite la formation d'invaginations qui aboutissent à la formation de vésicules intraluminales dans les endosomes, qui deviennent alors les corps multivésiculaires (Piper et Luzio 2001)

Les complexes de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT pour « Endosomal Sorting Complexes Required for Transport ») rassemblent une trentaine de protéines formant cinq complexes distincts qui exécutent une réaction de bourgeonnement et scission membranaire. Les ESCRT sont impliquées dans la biogénèse des corps multivésiculaires (**Figure 1.28**), mais aussi dans le bourgeonnement de particules virales ou encore la cytokinèse (Alonso Y Adell et Teis 2011) (Schmidt et Teis 2012).

Les cinq complexes protéiques sont nommés ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III et ESCRT-IV (ou Vps4Vta1). Ces complexes fonctionnent en présence d'une grande variété de protéines adaptatrices. Les ESCRT ont été initialement identifiés chez la levure, en tant que protéines indispensables pour la formation de corps multivésiculaires intervenant dans le tri des protéines membranaires appelés vps pour « vacuolar protein sorting » (Hurley 2010). Des homologues ont ensuite été identifiés dans une grande variété d'organismes allant des archéobactéries aux eucaryotes supérieurs (Wollert et al. 2009).

Dans le cas de la formation de corps multivésiculaires, les complexes ESCRT-0 à ESCRT-II s'assemblent dans le cytoplasme au stade précoce. Le complexe initiateur ESCRT-0 est spécifiquement retrouvé chez les animaux et mycètes, mais des analogues existent chez des eucaryotes plus anciens et chez les plantes. Le complexe ESCRT-0 se lie aux membranes des

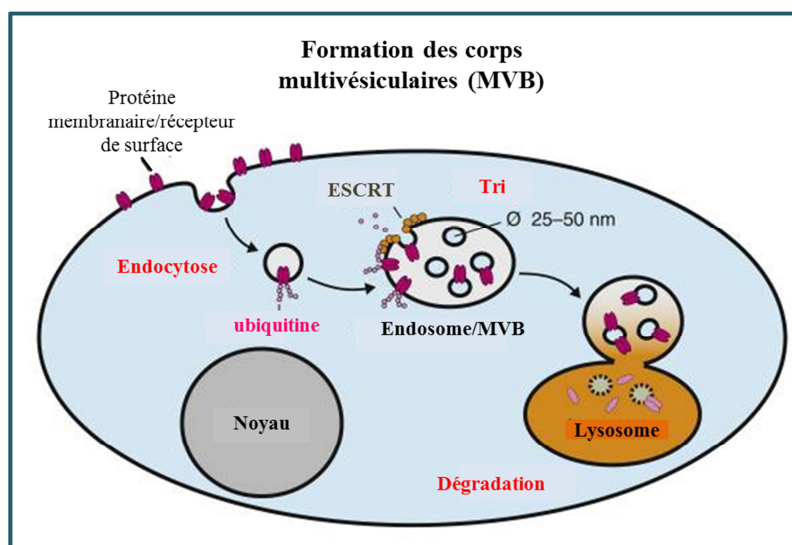


Figure 1.28 ; Représentation schématique de la formation des corps multi-vésiculaires par les complexes ESCRT. Dans le cas de la formation de corps multivésiculaires, les complexes ESCRT se lient à la partie ubiquitinylée des récepteurs en cours de dégradation et engagés dans la voie endosomale. Après liaison, les complexes ESCRT catalysent le remodelage de la membrane des endosomes pour former des vésicules intraluminales de 50nm de diamètre environ donnant naissance aux corps multivésiculaires. La formation de ces vésicules contenant les récepteurs à dégrader, dans la lumière des endosomes, est nécessaire pour leur dégradation complète.

Figure adaptée de (Schmidt et Teis 2012).

endosomes enrichies en PIP-3 et interagit avec les ubiquitines attachées aux molécules destinées à être dégradées. Le complexe ESCRT-0 permet le recrutement d'ESCRT-I qui interagit à son tour avec ESCRT-II. ESCRT-I et -II sont retrouvés chez tous les eucaryotes allant des protozoaires aux métazoaires les plus récents. L'ensemble ESCRT-0-I-II forme une plateforme essentielle pour l'assemblage du complexe ESCRT-III. Les complexes ESCRT-III et IV interviennent donc à un stade tardif pour la formation des corps multivésiculaires. ESCRT-III a la capacité de polymériser pour former un réseau de filaments circulaires qui déforme la membrane des endosomes et permet la formation de vésicules intraluminales (**Figure 1.29**). ESCRT-IV désassemble la machinerie ESCRT-III permettant le recyclage de ses constituants.

Plusieurs études ont récemment suggéré l'implication des ESCRT dans la machinerie de réparation membranaire. Il a tout d'abord été observé qu'une élévation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire conduit au recrutement à la membrane plasmique de plusieurs composants du complexe ESCRT-III (Scheffer et al. 2014). Dans des cellules HeLa endommagées, le recrutement de composants du complexe ESCRT-III au niveau des sites de lésions, mais aussi des protéines du complexe ESCRT-IV, a également été observé (Jimenez et al. 2014). Dans ce cas, le recrutement est dépendant du Ca^{2+} mais indépendant de la voie endosomale/lysosomale ou de la dépolymérisation des microtubules. Les auteurs ont observé que, quel que soit le type de dommages, la rupture était suivie d'un bourgeonnement au niveau de la zone membranaire endommagée, puis de l'émission de particules dans le milieu extracellulaire. La dépendance à

l'ATP de ce processus a suggéré l'implication d'ESCRT-IV dans ce mécanisme de réparation pour le recyclage ou compléter le détachement des bourgeons de la membrane plasmique. Les auteurs ont également montré que la diminution de l'expression de CHMP2A, un constituant du complexe ESCRT-III, inhibait la réparation membranaire. Leurs résultats ont permis de conclure que les ESCRT pouvaient assurer la réparation des petites lésions membranaires (inférieures à 100nm), en médiant le relargage des zones membranaires endommagées. Leur étude a montré, en revanche, l'incapacité des complexes ESCRT à promouvoir la réparation membranaire de grandes ruptures mécaniques. Ce point reste néanmoins un sujet à débat puisque pour des myoblastes murins, il a été observé que l'inhibition de l'expression de composants d'ESCRT (ALG-2, Alix et Vsp4) entraînait une susceptibilité plus importante aux lésions induites par irradiation laser (Scheffer et al. 2014). Le(s) rôle(s) joué(s) par les ESCRT dans la réparation membranaire nécessite des investigations approfondies.

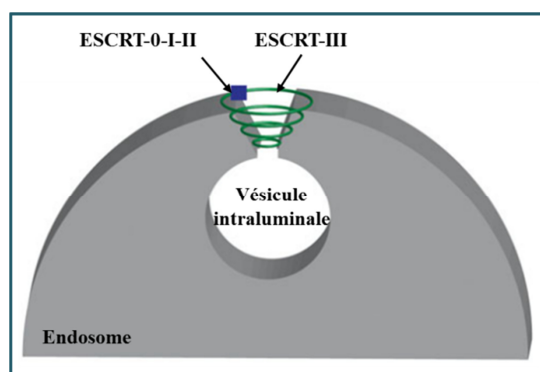


Figure 1.29 : Fermeture des vésicules intraluminales par la machinerie ESCRT. Les complexes ESCRT-0, I et II se lient successivement à la membrane des endosomes dans le cytosol, via l'interaction d'ESCRT-0 avec les ubiquitines liées aux récepteurs à dégrader. Ensemble ils forment une plateforme pour l'assemblage stable d'ESCRT-III qui forme une structure filamenteuse responsable de la formation des vésicules intraluminales à l'intérieur des endosomes. Figure adaptée de (Schuh et Audhya 2014).

B3.a4-La protéine MG53 (ou TRIM72) :

La protéine Mitsugumin-53 (MG53) est une protéine appartenant à la superfamille des protéines à motif tripartite (TRIM pour « TRIPartite Motif »). Ces protéines sont présentes chez tous les métazoaires, mais leur nombre varie beaucoup selon les espèces. Ainsi 65 et 64 membres des TRIM sont répertoriés chez l'Homme et la souris, respectivement. A peine 20 membres ont été identifiés chez le ver *C.elegans* (Ozato et al. 2008) suggérant que ces protéines ont beaucoup évolué au cours du temps et notamment chez les mammifères « supérieurs ». Bien que 11 familles distinctes composent la superfamille des TRIM (Ozato et al. 2008), toutes ces protéines ont en commun la présence d'un domaine N-Terminal tripartite très conservé appelé RBCC. Ce motif tripartite est composé dans le sens N- vers C-Terminal, d'un domaine RING, de 1 à 2 domaines B-box (notés B1 et B2) ainsi que, dans la plupart des cas, d'un domaine CC (Coiled-Coiled). Le domaine RING est un domaine de liaison au zinc responsable d'une activité Ubiquitine-ligase E3. Le ou les domaine(s) B-box sont aussi des motifs de liaison au zinc, permettant l'interaction avec d'autres protéines (Borden 1998). Enfin, le domaine CC permet l'homo- ou hétéro-oligomérisation des protéines TRIM. Les différentes familles de protéines TRIM sont répertoriées selon les motifs présents dans leur région C-Terminal.

MG53, aussi connu sous le nom de TRIM72, est une protéine de 53kDa spécifique du muscle cardiaque et du muscle strié squelettique (Levy, Campbell, et Glass 2013). Chez l'Homme, sa localisation subcellulaire est variable selon les individus (Waddell et al. 2011). Elle possède dans sa partie N-Terminale un domaine PRY-SPRY, spécifique des chordés. Des analyses structurales en cristallographie des rayons X ont montré que ce domaine PRY-SPRY forme, par le repliement d'un continuum de feuillets- β anti-parallèles et de boucles, une structure globulaire compacte caractérisée par la formation d'une poche (Grütter et al. 2006) (Park et al. 2010) pouvant accueillir des protéines cibles.

La découverte du rôle de MG53 dans la réparation membranaire est très récente (Cai, Masumiya, Weisleder, Matsuda, et al. 2009a).

Il a tout d'abord été observé que des souris déficientes pour MG53 développent une forme de dystrophie musculaire (Weisleder, Takeshima, et Ma 2008). Il a été montré que les fibres musculaires de ces souris sont incapables de survivre à la rupture de leur membrane plasmique après irradiation laser ou perforation à l'aide d'une micropipette. Pour les souris sauvages, MG53 a été observé comme s'accumulant au niveau des sites de rupture des fibres musculaires. Dans ces cellules, MG53 est exprimée au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans le cytoplasme, associée à des vésicules. Ils ont montré que son recrutement et sa polymérisation au site de rupture sont déclenchés par l'oxydation du milieu environnant et indépendant de la présence de Ca^{2+} . Les résultats accumulés ont permis de proposer le mode d'action suivant :

Dans les cellules intactes, MG53 cytoplasmique se trouve dans un état réduit, en interaction avec des PS à la membrane plasmique et au niveau de vésicules cytoplasmiques (**Figure 1.30A**).

Suite à la rupture de la membrane plasmique, l'oxydation intracellulaire provoque l'oligomérisation des monomères de MG53 ancrés à la membrane plasmique, avec ceux présents à la surface des vésicules cytoplasmiques, via des ponts disulfures (**Figure 1.30B**). Cette oligomérisation de MG53 facilite le recrutement et l'association des vésicules, afin de former une barrière s'opposant à l'entrée de milieu extracellulaire (**Figure 1.30C**). L'étape finale de colmatage de la rupture de la membrane plasmique est réalisée par fusion vésiculaire en présence de Ca^{2+} à forte concentration (**Figure 1.30D**). Le rôle de MG53, en tant qu'agent recruteur et stabilisateur des vésicules cytoplasmiques au niveau du site de rupture, en fait un bon candidat pour le traitement thérapeutique de dystrophies musculaires. Des expériences utilisant MG53 recombinant humaine ont été réalisées sur des souris mdx modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne (Weisleder et al. 2012). Il a été montré que l'injection de MG53 à une dose de 8mg/kg, deux fois par jour, pendant quatre jours, diminue significativement la proportion de fibres musculaires lésées.

Dans le muscle strié squelettique, MG53 interagit avec deux autres protéines, spécifiques du muscle, ayant un rôle dans la réparation du sarcolemme : la dysferline et la cavéoline-3 (Cai, Weisleder, Ko, Komazaki, et al. 2009b). Il a ainsi été montré que la co-expression ectopique, de la forme mutante P104L de la caveoline-3, et de MG53 entraîne la rétention des deux protéines dans l'appareil de Golgi.

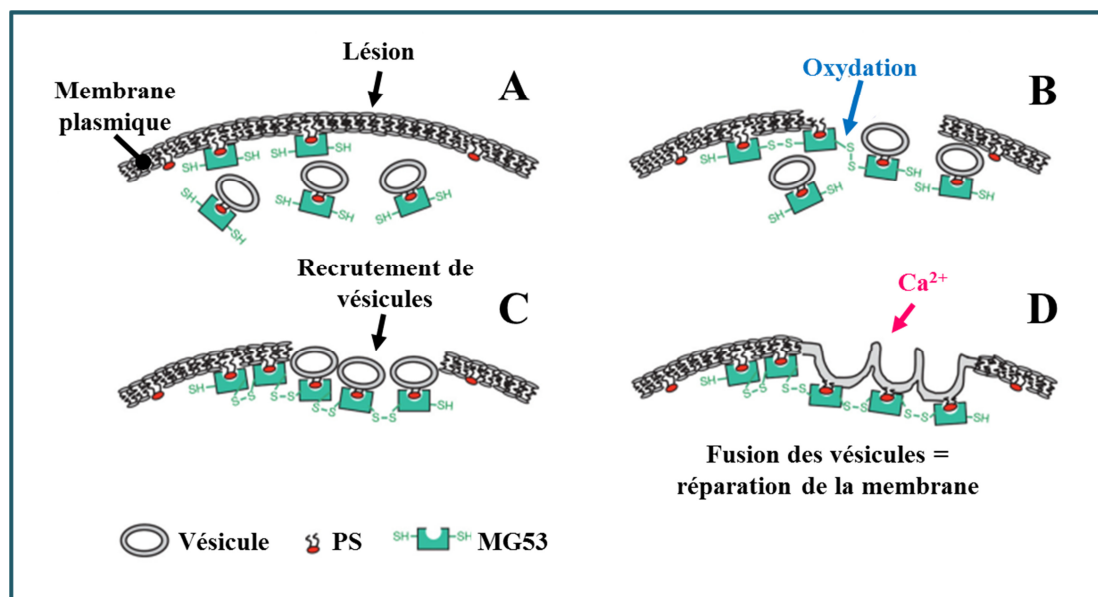


Figure 1.30 : Représentation schématique du mécanisme de participation de la protéine MG53 au processus de réparation membranaire. (A) Dans les cellules intactes, MG53 se trouve dans un état réduit, le cytoplasme étant un environnement réducteur. Il est lié à des PS à la fois à la membrane plasmique et à la surface de vésicules cytosoliques. (B) Suite à la rupture de la membrane plasmique, l'entrée du milieu extracellulaire oxydant provoque l'oligomérisation de monomères de MG53 ancrés à la membrane plasmique, avec ceux présents à la surface des vésicules cytosoliques par des ponts disulfures. (C) Cette oligomérisation de MG53 facilite le recrutement et l'association de vésicules cytosoliques pour former une première barrière s'opposant à l'entrée de milieu extracellulaire. (D) L'étape finale de colmatage de la rupture de la membrane plasmique se fait lorsque les vésicules fusionnent en présence de Ca^{2+} à forte concentration (Figure, D). MG53 aurait donc un rôle de recruteur et stabilisateur des vésicules cytosoliques au niveau du site de rupture. Figure adaptée de (Cai, Masumiya, Weisleder, Matsuda, et al. 2009a).

B3.a5-La cavéoline-3 :

La cavéoline-3 est une protéine membranaire d'environ 20kDa spécifique du tissu musculaire, retrouvée de façon mineure dans les cellules gliales (Silva et al. 2007). Des mutations de la cavéoline-3 conduisent à des formes diverses de dystrophies musculaires, regroupées sous le terme de cavéolinopathies. La forme majoritaire est la dystrophie des ceintures de type 1C (LGMD1C). Les autres pathologies correspondent à une forme de myopathie distale, une forme de myopathie bénigne appelée RMD (pour « Rippling Muscle Disease »), l'hyperCKémie (Gazzerro et al. 2010) et une forme de cardiomyopathie hypertrophique familiale (Hayashi et al. 2004). Les cavéolines ont une séquence spécifique conservée dans leur partie N-Terminale composée des acides aminés FEDVIEP (Williams et Lisanti 2004). Dans les muscles striés squelettiques la cavéoline-3 est associée aux tubules-T.

La cavéoline-3 est essentielle pour la formation de microdomaines membranaires invaginés de 60 à 80nm de diamètre, appelés cavéoles. Les cavéolines sont localisés majoritairement à la membrane plasmique mais elles peuvent être aussi présentes dans la membrane des saccules Golgiennes, du réticulum endoplasmique et de vésicules. La formation des cavéoles nécessite la présence de cavéolines oligomérisées et de protéines cytosoliques appelées cavines (Parton

Introduction

et del Pozo 2013). La séquence de la cavéoline-3 comprend dans la partie C-Terminale un domaine riche en cystéines. Ces cystéines palmitoylées forment un domaine d'accrochage à la membrane (**Figure 1.31A**) de forte affinité. La séquence de la cavéoline-3 est également composée d'une région transmembranaire en fer à cheval qui permet son ancrage dans la membrane. Elle possède, de plus, un domaine d'oligomérisation, appelé « Caveolin Scaffolding Domain ». Ce domaine est essentiel pour l'oligomérisation des cavéolines, mais il assure aussi

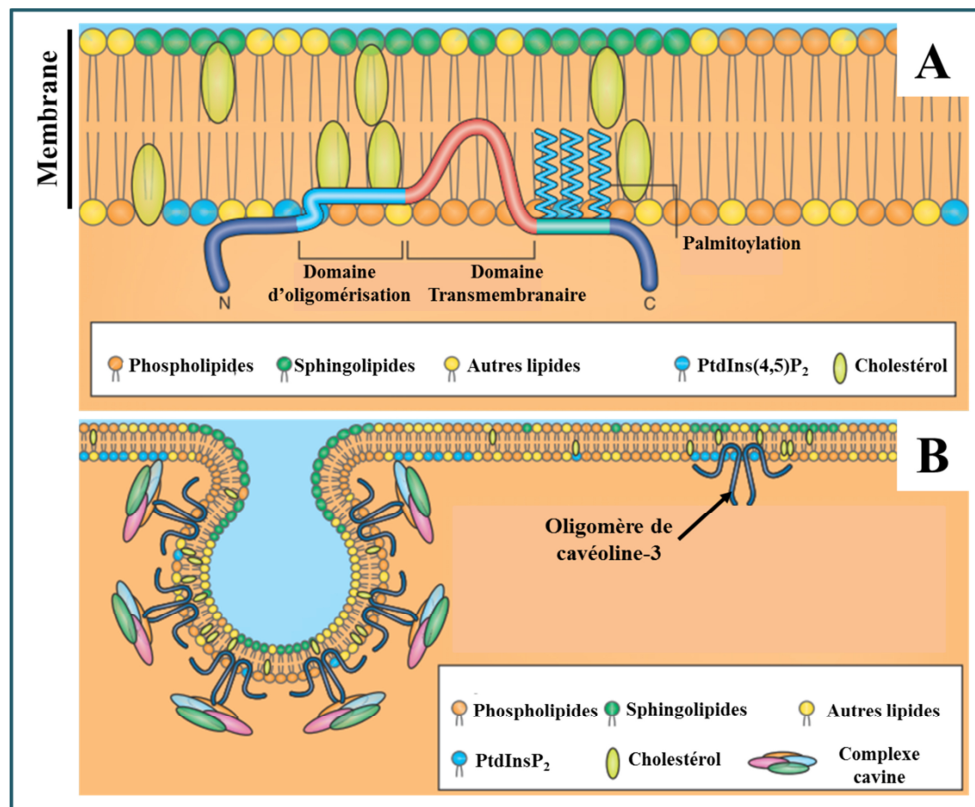


Figure 1.31 : Représentation schématique de la cavéoline-3 et des cavéoles. (A) La cavéoline-3 est une protéine membranaire spécifique du tissu musculaire, bien que présente également dans les cellules gliales. La séquence de 151 acides aminés de la cavéoline-3 comprend, de la partie C-Terminale vers la partie N-Terminale: un domaine d'attachement à la membrane riche en cystéines palmitoylées ; une région transmembranaire en fer à cheval qui ancre la cavéoline-3 dans la membrane ; un domaine d'oligomérisation appelé « Caveolin Scaffolding Domain ». Le domaine d'oligomérisation est essentiel pour l'oligomérisation des cavéolines ainsi que pour des interactions avec d'autres protéines. Cette représentation schématique est une représentation simplifiée de la structure générale des cavéolines. Par soucis de simplification, le domaine WW n'est pas présenté. Ce domaine permettrait son interaction avec le β-dystroglycane un composant de complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (F. Sotgia et al. 2000). (B) Dans le tissu musculaire, la cavéoline-3 est indispensable pour la formation des cavéoles. Les caveoles sont des microdomaines membranaires très particuliers, car invaginés, en forme d'escarcelle de 60 à 80nm de diamètre. Les cavéoles sont enrichies en lipides comme les sphingolipides et le cholestérol. La formation des cavéoles nécessite la présence de cavéolines oligomérisées et de protéines cytosoliques, appelées cavines. Une fois à la membrane plasmique le complexe cavine cytosolique est recruté pour former les cavéoles on estime qu'une cavéole est composée de 140 à 180 cavéolines (Bastiani et Parton 2010).

l'interaction avec d'autres protéines (Razani et Lisanti 2001). Les cavéolines nouvellement synthétisées s'insèrent dans la membrane du réticulum endoplasmique en structures à épingle à cheveux où elles vont s'organiser en homo-oligomères de 7 à 14 cavéolines (Hayer et al. 2010). Ces oligomères sont transportés vers l'appareil de Golgi, où ils se regroupent dans des complexes de 14 à 16 molécules et sont palmytoylés, avant d'être acheminés à la membrane par exocytose. Une fois à la membrane plasmique, le complexe cavine est recruté pour former les cavéoles (**Figure 1.31B**). On estime qu'une cavéole est composée de 140 à 180 cavéolines (Pelkmans et Zerial 2005).

Les cavéoles sont impliquées dans de multiples voies comme l'endocytose, la transcytose, l'homéostasie du cholestérol, la transduction du signal dans de nombreuses voies de signalisation et la réponse au stress mécanique (Bastiani et Parton 2010), (Parton et del Pozo 2013).

Il a été montré que, dans des fibres musculaires striées squelettiques de grenouille, les cavéoles s'aplanissent pour contrer la tension membranaire induite par une elongation mécanique du sarcolemme (Dulhunty et Franzini-Armstrong 1975)

L'aplanissement des cavéoles est un processus rapide, de l'ordre de la minute, qui se réalise par dissociation réversible des cavines à la cavéoline-3, de façon indépendante de l'ATP et de l'actine (Sinha et al. 2011). Pour des patients porteurs de la mutation P28L de la cavéoline-3, une augmentation de la tension membranaire et une hypersensibilité aux ruptures membranaires ont été observées (Sinha et al. 2011). Un résultat similaire a été observé dans des cellules épithéliales de langue de Vison rendues déficientes en cavine-1. Les cavéoles semblent donc jouer un rôle préventif, limitant l'apparition de rupture de la membrane plasmique, en contrôlant la tension membranaire.

Les cavéoles semblent également jouer un rôle direct dans la réparation membranaire. Dans des fibroblastes de rat, il a été montré que la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique inhibe la réparation membranaire, par absence de mécanisme d'endocytose (Idone et al. 2008). Or, la déplétion en cholestérol inhibe la formation de cavéoles, ainsi que des mécanismes d'endocytose dépendants des cavéoles (Nichols 2003).

Le traitement à la SLO de cellules NRK entraîne la formation de cavéoles et l'accumulation de vésicules dérivées des cavéoles (cavéosomes) à proximité de la membrane plasmique, en quelques secondes (**Figure 1.32, 30s**) (Corrotte et al. 2013). La fusion des cavéosomes et leur maturation conduisent à la dégradation de la SLO endocytée par la voie des corps multi-vésiculaires/lysosomale (**Figure 1.32**). Il a été observé que la lésion mécanique de la membrane plasmique, dans ces cellules, entraîne aussi un mécanisme d'endocytose dépendant des cavéoles, mais sous la forme de très grosses structures membranaires connectées au site de rupture. La formation de cavéosomes, associée à la réparation membranaire de dommages créés par les PFTs, a été montrée comme dépendant de la présence de SMA dans le milieu extracellulaire (Corrotte et al. 2013). Parallèlement, il a été observé que la formation de domaines riches en céramides est suffisant pour induire la formation de cavéosomes (Draeger et Babiychuk 2013).

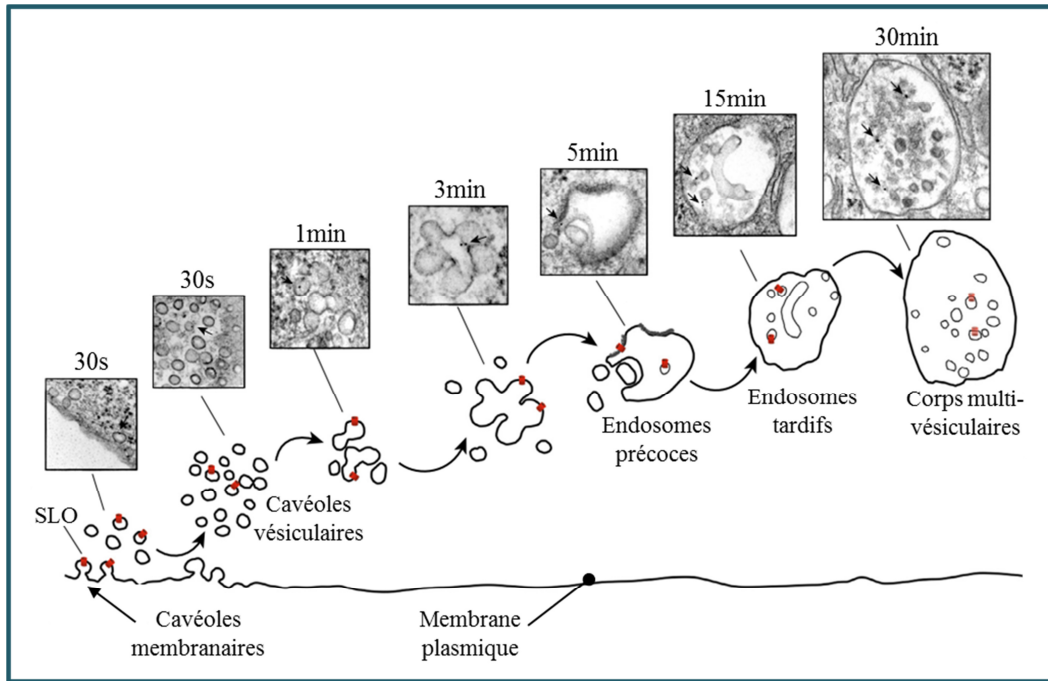


Figure 1.32 : Phénomène d'endocytose dépendant des cavéoles (formation de cavéosomes) observé après traitement de cellules avec la toxine bactérienne SLO. Pour la lignée de fibroblastes de rat NRK, il a été observé que les pores transmembranaires, formés par les polymères de SLO, sont endocytés dans des vésicules dérivées de cavéoles membranaires dès les 30 premières secondes après perforation de la membrane plasmique. Ces vésicules cavéolaires s'agrègent pour former des endosomes après 5 minutes. Ils forment ensuite des corps multivésiculaires, entre 15 et 30 minutes après perforation de leur membrane. La formation des corps multivésiculaires est suivie de la formation de lysosomes et la dégradation des polymères de SLO endocytés. Les images montrées à chaque étape sont des images obtenues en microscopie électronique à transmission. Figure adaptée de (Andrews, Almeida, et Corrotte 2014).

Deux mécanismes émergent de ces observations. Dans le premier mécanisme (**Figure 1.33A**), l'augmentation locale de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, après la perforation de la membrane plasmique, entraîne le recrutement de vésicules d'exocytose, qui libèrent des SMA dans le milieu extracellulaire, provoquant la formation de plateformes de céramides. La formation de ces plateformes initie le phénomène d'endocytose. Les PFTs sont alors dégradées par la voie lysosomale. Dans le second mécanisme (**Figure 1.33B**), une grande rupture mécanique de la membrane plasmique entraîne une augmentation rapide de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire libre. Cette augmentation rapide est suivie d'une sécrétion importante de SMA (**Figure 1.33B1**) et la formation d'une grande surface de plaques de céramides autour de la rupture. Cette région enrichie en céramides provoque la formation d'une grande quantité de cavéosomes (**Figure 1.33B2**). La fusion des cavéosomes, en cours d'endocytose, génère la constriction de la zone lésée (**Figure 1.33B3**). L'excès membranaire est éliminé via la formation d'un compartiment endosomal de taille importante (**Figure 1.33B4**).

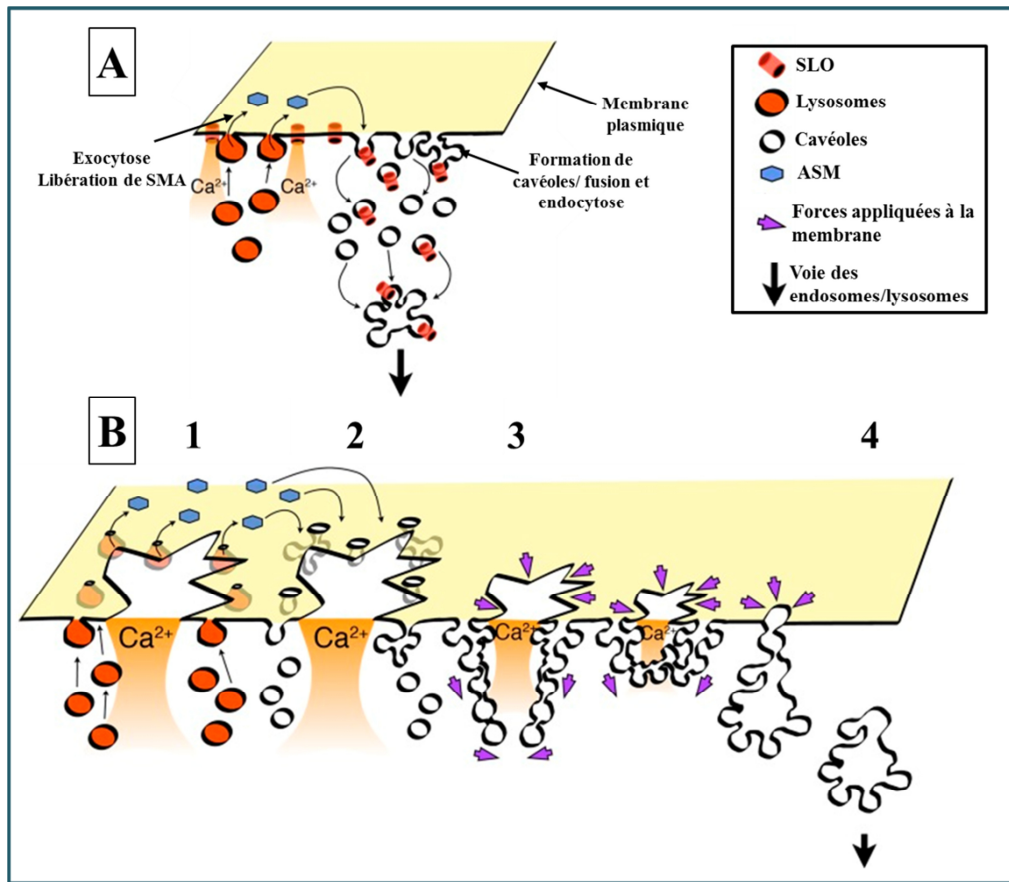


Figure 1.33 : Mécanismes potentiels des cavéoles dans la réparation membranaire suite à la perforation par des PFTs ou à la rupture mécanique de la membrane plasmique. (A) Dans le cas de la perforation par des PFTs, il a été proposé que l'augmentation locale de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire entraîne le recrutement de vésicules d'exocytose qui libèrent, dans le milieu extracellulaire, des SMA, provoquant la formation de plaques de céramides et le phénomène d'endocytose dépendant des cavéoles. Les PFTs insérées dans la membrane sont alors dégradées par la voie lysosomale. **(B)** De grandes ruptures mécaniques entraînent une augmentation rapide de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire libre. Cette augmentation est suivie d'une exocytose importante de SMA (1) dans le milieu extracellulaire et la formation d'une grande plateforme de céramides autour de la rupture. Une quantité importante de cavéosomes est alors produite (2). La fusion des cavéosomes, associée à l'endocytose, créent un phénomène de constriction du site de rupture (3) jusqu'à fermeture complète de la membrane lésée. La région membranaire endocytée forme alors compartiment endosomal important (4). Figure adaptée de (Andrews, Almeida, et Corrotte 2014).

La cavéoline-3 interagit avec d'autres protéines impliquées dans la réparation membranaire comme MG53 (Cai, Weisleder, Ko, Komazaki, et al. 2009a) et la dysferline (C. Matsuda et al. 2001). De nombreuses mutations de la séquence codant la cavéoline-3 conduisant à divers types de cavéolinopathies, ont été répertoriées (F. Galbiati, Razani, et Lisanti 2001) (Chie Matsuda et al. 2001) (Hernández-Deviez et al. 2006). Certaines de ces mutations (R27Q, T64P) ont été montrées comme associées à une diminution de l'expression de la dysferline (C. Matsuda et al. 2001) ou encore (P104L) à la rétention de MG53 et de la dysferline au niveau de l'appareil de Golgi (Cai, Weisleder, Ko, Komazaki, et al. 2009b). De même, certaines dystrophies musculaires, résultant de mutations de la séquence codant la dysferline, induisent

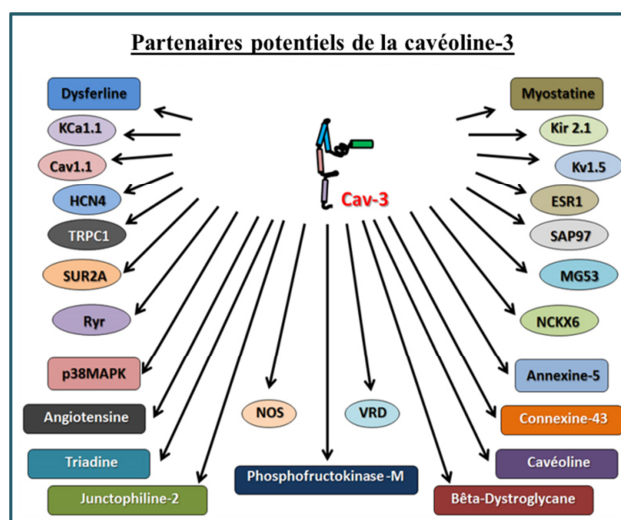


Figure 1.34 : Représentation schématique des différents partenaires de la cavéoline-3 (CAV-3) décrits dans la littérature. Figure tirée du site de l'Université de Montpellier.

<http://u1046.edu.umontpellier.fr/163-2/formation/caveoline-3/>

une baisse de l'expression de la cavéoline-3 (Walter et al. 2003). Ces observations indiquent que plusieurs cas de dystrophies musculaires sont associés à un niveau d'expression anormal de la cavéoline-3 ou à une localisation subcellulaire altérée. La cavéoline-3 possède de nombreux autres partenaires (**Figure 1.34**) lui permettant d'intervenir dans différentes étapes de la réparation membranaire.

B3.a6-AHNAK/Desmoyokine :

La desmoyokine ou AHNAK (géant en hébreux) est une protéine ubiquitaire de 700kDa environ et 170nm de long (T. A. Davis, Loos, et Engelbrecht 2014). Dans les cellules, elle participe à plusieurs fonctions telles que le maintien de la morphologie, la migration, la formation des desmosomes et elle est impliquée dans des voies de signalisation. AHNAK est composée de trois domaines : 1) un domaine PDZ N-Terminal de 251 a.a pouvant lier d'autres protéines et contenant un site de clivage pour la calpaïne-3, 2) un domaine central d'environ 4300 acides aminés pouvant se lier aux isoformes γ de phospholipase C (PLC γ) et α de PKC (PKC α) et contenant des sites de clivage pour le granzyme B et la caspase-3, 3) un domaine C-Terminal de 1002 acides aminés pouvant lier des canaux calciques, l'actine sous forme monomérique et polymérisée, le tétramère AnxA2/S100A10 et le domaine C2a de la dysferline. Ce dernier domaine contient deux sites de clivage pour la calpaïne-3. AHNAK est un marqueur de vésicules intracellulaires riches en cholestérol et sphingolipides, appelées enlargeosome. L'enlargeosome est aussi en partie défini par la présence de l'hétérotétramère AnxA2/S100A10. Cet hétérotétramère est requis pour l'exocytose Ca^{2+} -dépendante du contenu vésiculaire. Plusieurs observations expérimentales ont conduit à proposer qu'AHNAK et les enlargeosomes participent à la réparation du sarcolemme. Il a été observé

que la lésion de la membrane plasmique de cellules de rat de la lignée PC12 est suivie d'un recrutement rapide de vésicules positives pour AHNAK au niveau du site de rupture (Borgonovo et al. 2002). AHNAK a été montrée comme interagissant avec la dysferline au niveau des tubules T dans le tissu musculaire strié squelettique humain sain (Huang et al. 2007). Chez des patients souffrant de dystrophie musculaire des ceintures de type 2B (LGMD2B, déficit en dysferline), AHNAK présente une localisation subcellulaire altérée (Zacharias et al. 2011). Il a été suggéré qu'AHNAK pourrait former avec la dysferline et le tétramère AnxA2/S100A10 un complexe protéique régulé par l'activité protéolytique de la calpaïne-3 (Huang et al. 2008). Les enlargeosomes pourraient contribuer à l'enrichissement en cholestérol et en sphingolipides au niveau du site de rupture (Cocucci et al. 2007) et ainsi faciliter la formation de plateformes lipido-protéiques à haute capacité de fusion.

B3.a7-Les canaux calciques :

Il a été montré que des canaux calciques voltages dépendants de type L facilitent le recrutement de deux protéines impliquées dans la réparation membranaire : MG53 et la dysferline. En inhibant spécifiquement ces canaux pour des myotubes humains, il a été mis en évidence une altération spatiale de la liaison de ces protéines au niveau du site de rupture et l'inhibition de la formation de mini-dysferline_{c72} (Lek et al. 2013).

La rupture de la membrane plasmique entrainerait un changement de potentiel membranaire activant les canaux à proximité du site de rupture. Leur activation provoquerait une entrée de Ca^{2+} supplémentaire permettant d'activer les protéines responsables de la formation de la mini-dysferline_{c72} et le recrutement de la dysferline et de MG53 à la membrane bordant le site de rupture (**cf Figure 2.6**).

Un autre canal connu sous le nom de mucolipin-1 ou TRPML-1 serait impliqué dans la réparation membranaire. Ces canaux retrouvés chez les vertébrés et appartenant à la superfamille des canaux non sélectifs à cations TRP (Transient receptors potential) sont connus comme des canaux sensoriels impliqués dans la photoréception, proprioception, nociception, thermoception et mécanosensation (Venkatachalam et Montell 2007). Le blocage de ces canaux chez les myoblastes C2C12 inhibe la réparation membranaire et réduit l'exocytose lysosomale (Cheng et al. 2014). Des souris knock-out pour ce canal développent, dès le premier mois après leur naissance, une forme de dystrophie musculaire et les fibres musculaires isolées de ces souris sont incapables de réparer des lésions de leur sarcolemme.

B3.b. Les protéines à activité Ca^{2+} -dépendante

Il est maintenant avéré que l'influx de Ca^{2+} dans le cytoplasme est indispensable pour la réparation de la membrane plasmique, quel que soit le type de dommage. Ces observations font du Ca^{2+} un acteur essentiel pour l'initiation de la réparation de la membrane plasmique suite à une lésion. De ce fait, il n'est pas étonnant de constater que plusieurs protéines directement impliquées dans la réparation membranaire sont des protéines sensibles au Ca^{2+} .

B3.b1-Les protéines à domaine C2 :

Les protéines à domaine C2 forment une superfamille de protéines transmembranaires ou solubles ayant en commun la présence dans leur séquence d'au moins un motif conservé de liaison au Ca^{2+} et aux membranes biologiques, composé d'environ 130 acides aminés et nommé C2 (Nalefski et Falke 1996). Le domaine C2 a été identifié comme 1 des 4 domaines conservés (C1-C4) dans les isoformes α , β et γ de la protéine kinase C. Chez l'Homme, on estime actuellement à 233 le nombre de domaines C2 répartis dans 127 protéines, faisant de ce domaine le second domaine de liaison aux lipides le plus abondant trouvé dans les protéines humaines (Leonard 2013). Trois topologies différentes de domaine C2 ont été décrites. Ces différentes topologies ont des tailles et des agencements très similaires (**Figure 1.35**). Toutes ont en commun une organisation en repliement de type sandwich- β (**Figure 1.35, représentation 3D**), via la superposition de deux feuillets- β , composés pour chaque de 4 brins- β anti-parallèles (**Figure 1.35, représentation 2D**). Au niveau de certaines boucles, des séquences conservées (appelées CBR pour « Ca^{2+} Binding Region »), riches en acides aminés chargés négativement, assurent les interactions Ca^{2+} -dépendante avec les membranes biologiques (**Figure 1.35, représentation 2D, boucles vertes**).

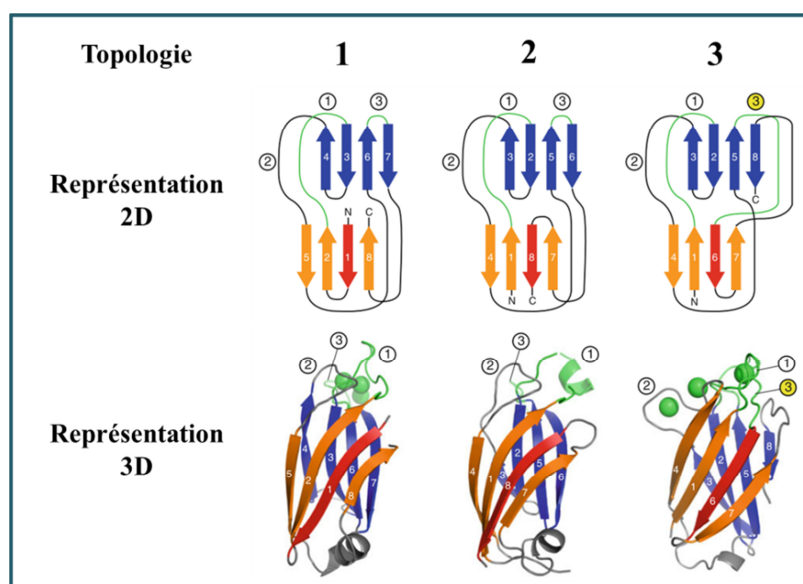


Figure 1.35 : Représentation schématique des différentes topologies connues des domaines C2. Actuellement, trois topologies différentes de domaines C2 ont été identifiées. Elles sont toutes organisées en repliement de type sandwich- β (représentation 3D) par superposition de deux feuillets- β , composés, pour chaque, de 4 brins- β anti-parallèles (représentation 2D). Les brins- β sont connectés entre eux soit par des boucles de séquences variables, soit par des boucles de séquences plus conservées, riches en acides aminés chargés négativement appelées CBR (pour « Ca^{2+} Binding Region »). Ces dernières sont responsables de leur interaction Ca^{2+} -dépendante avec les lipides membranaires (vert). En fait, en absence de Ca^{2+} , le repliement de ces boucles forme une poche acide. La liaison du Ca^{2+} (représentation 3D, boules vertes) modifie les caractéristiques électrostatiques de la poche lui permettant de se lier à des phospholipides. Figure adaptée de (Leonard 2013).

La liaison du Ca^{2+} (**Figure 1.35, représentation 3D, boule verte**) modifie les caractéristiques électrostatiques de la poche lui permettant de se lier à des phospholipides très souvent chargés négativement comme la PS (Lemmon 2008). Les mécanismes de liaison de ces domaines C2 à une membrane cible ne sont pas encore très clairement connus, mais il a été proposé que certains de ces domaines peuvent se lier aux membranes par pénétration partielle (Cho 2001), (Hui, Bai, et Chapman 2006). Les concentrations calciques permettant la liaison d'un domaine C2 à des lipides cibles sont comprises entre 5 et 50 μM . Généralement 2 à 3 ions Ca^{2+} sont liés par domaine C2. La liaison d'un domaine C2 aux lipides est le plus souvent peu spécifique (Lemmon 2008).

-Les synaptotagmines (synt) : Les synaptotagmines sont caractérisées par la présence d'un domaine transmembranaire dans la région N-Terminale et de 2 domaines C2 (C2a et C2b) dans la région C-Terminale, séparés par une région « linker » (**Figure 1.36A**).

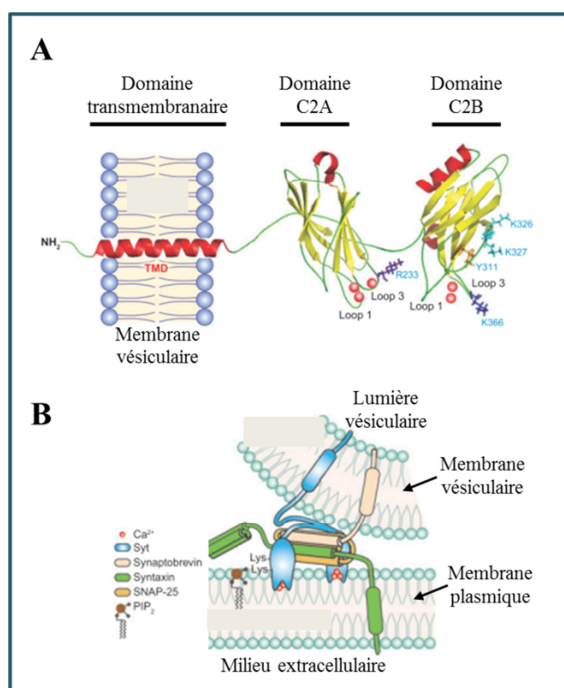


Figure 1.36 : Représentation schématique de la structure générale des synaptotagmines et de la fonction de la Syt-1 dans la sécrétion de vésicules synaptiques. (A) Les synaptotagmines sont caractérisées par la présence d'un domaine transmembranaire dans la région N-Terminale et de deux domaines C2 (C2a et C2b) dans la région C-Terminale, séparés par une région linker. (B) La Syt-1 est présente à la surface des vésicules synaptiques. Sa liaison au Ca^{2+} permet l'arrimage des vésicules à la membrane plasmique et l'extension du pore de fusion entre les vésicules synaptiques et la membrane plasmique. Figure adaptée de (Chapman 2008).

La Syt-1, une protéine de 65 kDa, fut le premier membre de cette famille identifié. Présente à la surface des vésicules synaptiques, sa liaison au Ca^{2+} permet l'arrimage des vésicules à la membrane plasmique et l'extension du pore de fusion entre les vésicules synaptiques et la membrane plasmique. A la membrane plasmique, elle interagit majoritairement avec les PS et le phosphoinositide PIP_2 . Ses partenaires protéiques sont des protéines de la famille SNARE comme SNAP-25 (**Figure 1.36B**) (Chapman 2008). 15 membres différents ont été identifiés chez les mammifères (Campbell 2014). Elles sont retrouvées ancrées dans divers types de membranes dont la membrane plasmique ou la membrane de vésicules comme les lysosomes (Arantes et Andrews 2006). Des gènes homologues des gènes codant ces protéines chez l'Homme ont été identifiés chez des organismes tels que le nématode *C.elegans*, la plante

Introduction

brassicacée *Arabidopsis thaliana* ou encore le diptère *Drosophila melanogaster* (Craxton 2001) faisant de ces protéines un outil senseur du Ca^{2+} impliqué dans des événements d'exocytoses très répandus dans le monde du vivant.

La synaptotagmine-7 (Syt-VII), présente à la surface des vésicules lysosomales et d'autres vésicules sécrétoires indispensables à la formation de la matrice (Zhao et al. 2008) ou la sécrétion d'insuline, a été identifiée comme essentielle dans la réparation membranaire. Il a été montré qu'elle est exposée à la surface de nombreux types cellulaires après lésion de la membrane plasmique (Reddy, Caler, et Andrews 2001). L'inhibition de Syt-VII lors de lésion cellulaire entraîne un défaut d'exocytose lysosomiale associée à une perturbation de la cinétique de réparation membranaire dans de nombreux types cellulaires (Reddy, Caler, et Andrews 2001) (Chakrabarti et al. 2003). De plus, les souris knock-out pour Syt-VII développent une fibrose de la peau et du tissu musculaire strié squelettique associée à une myopathie inflammatoire.

-Les ferlines : Les ferlines forment une famille de protéines à multiples domaines C2 identifiées chez l'Homme à la fin des années 1990 (Lek et al. 2012). Elles sont retrouvées chez la plupart des eucaryotes sauf chez les plantes vasculaires, amibes et les mycètes. Chez les mammifères, 6 membres (de Fer1L1-L6) ont été identifiés. Ce sont des protéines avec une masse moléculaire importante (200-240kDa) qui contiennent toutes un domaine transmembranaire dans leur partie C-Terminale et 5 à 7 domaines C2 (**Figure 1.37**).

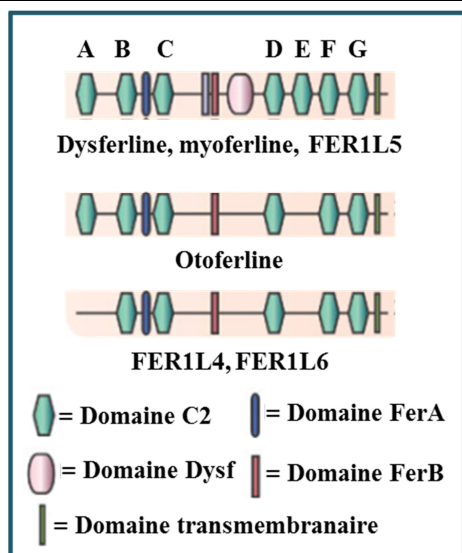


Figure 1.37 : Représentation schématique simplifiée des différentes ferlines connues chez les mammifères. Les ferlines forment une famille de protéines à multiples domaines C2. Chez les mammifères, 6 membres (Fer1L1 = dysferline, FER1L2 = Otoferline, FER1L3 = myoferline, FER1L4-L6) ont été identifiés. Ce sont des protéines qui contiennent toutes un domaine transmembranaire dans leur partie C-Terminale et 5 à 7 domaines C2, nommés selon leur ordre dans le sens de l'extrémité N-Terminale vers l'extrémité C-Terminale. Elles sont séparées en deux groupes en fonction de la présence dans leur chaîne d'un domaine DYSF. Figure adaptée de (Lek et al. 2010).

Ce nombre important et inhabituel de domaines C2, en comparaison aux autres membres de la superfamille, suggère des événements évolutifs de duplication de ce motif et une spécialisation au cours du temps. Elles sont séparées en deux groupes en fonction de la présence ou non d'un domaine DYSF, dont la fonction reste mal comprise (Sula et al. 2014). Des mutations de la séquence des ferlines sont associées à différentes pathologies, telles que

des dystrophies musculaires (dysferline), des syndromes de surdité (otoferline) chez l'Homme et la souris et l'infertilité chez *C.elegans* (Fer-1) et *Drosophila melanogaster* (misfire) (Lek et al. 2012).

Chez l'Homme, toutes les ferlines ne sont pas ubiquitaires. L'otoferline est exprimée dans le cerveau, le système vestibulaire et la cochlée. La myoferline est exprimée dans un nombre restreint de tissus comprenant le placenta et le tissu musculaire cardiaque, dans lesquels elle est fortement exprimée, et dans les cellules endothéliales, de la langue, du pancréas et des reins, où elle est plus faiblement exprimée (D. B. Davis et al. 2000) (Bernatchez et al. 2007). Durant la myogénèse du tissu musculaire strié squelettique, la myoferline est fortement exprimée dans les myoblastes, puis son expression diminue durant la différenciation/fusion de ces cellules pour la formation des fibres musculaires. Au contraire, la dysferline est très faiblement exprimée dans les myoblastes et très fortement exprimée dans les myotubes et fibres musculaires matures (Doherty et al. 2005). Dans le tissu placentaire, la myoferline et la dysferline sont exprimées dans les cellules trophoblastiques, l'expression de la dysferline augmentant lors de la formation des syncytia trophoblastiques. La dysferline est ubiquitaire mais est exprimée fortement dans le tissu musculaire strié squelettique et le tissu musculaire cardiaque (Anderson et al. 1999), où elle est présente insérée dans la membrane plasmique.

La dysferline fut la première ferline identifiée chez l'Homme, lors d'étude génétique sur l'origine de certaines dystrophies musculaires. Des mutations de sa séquence codante sont à l'origine de deux types de dystrophies musculaires autosomales récessives : la dystrophie des ceintures de type 2B (LGMD2B) et la myopathie de Myoshi de type 1 (MMD1) (Rumaisa Bashir et al. 1998), (Liu et al. 1998). La dysferline a été la première protéine permettant de mettre en relation un défaut de réparation membranaire et le développement de certaines dystrophies musculaires, regroupées sous le terme de dysferlinopathies (Bansal et al. 2003). Les travaux de Bansal et ses collaborateurs ont mis en évidence que des souris knock-out pour la dysferline étaient incapables de réparer des dommages du sarcolemme de leurs fibres musculaires. L'accumulation de vésicules cytoplasmiques dans la région corticale des fibres musculaires de ces souris a suggéré que l'absence de dysferline empêchait l'accrochage du « patch » lipidique au site de rupture. La dysferline possède effectivement des propriétés fusog niques. Les différents domaines C2 de la dysferline peuvent lier plusieurs lipides retrouvés dans les membranes biologiques dont la PS, le PtdIns(5)P et PtdIns(4)P (Therrien et al. 2009). La présence du Ca^{2+} augmente leur affinité pour les membranes contenant de la PS (Abdullah et al. 2014). L'interaction des domaines C2 avec des membranes contenant de la PS modifie la structure de la bicouche en induisant une courbure et un regroupement des phospholipides chargés négativement qui favoriseraient la fusion membranaire (Marty et al. 2013). L'augmentation de la concentration locale en Ca^{2+} , suite à une rupture de la membrane plasmique, initierait donc la liaison de la dysferline aux membranes accessibles, qu'elles soient vésiculaires ou plasmique. La présence de dysferline à la membrane de vésicules dans des cellules musculaires striées squelettiques a été observée in vivo (Roostalu et Str hle 2012).

Une forme tronquée de dysferline, appelée mini-dysferline_{c72}, a également été identifiée à la surface de vésicules intracellulaires (Lek et al. 2013). Cette mini-dysferline_{c72}, d'une masse

moléculaire de 72kDa, est générée à partir de la dysferline, par clivage protéolytique catalysée par une calpaïne, suite à l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. Il a été montré que le recrutement de vésicules couvertes de mini-dysferline_{c72} est impliqué dans la réparation membranaire. La dysferline est hydrolysée entre les domaines C2E et C2F, dans une région codée par l'exon 40a (Redpath et al. 2014). L'exon 40a est un exon présent dans un variant d'épissage. Ce variant a été observé dans différents types cellulaires, tels que les astrocytes, les cardiomyocytes, les cellules endothéliales humaines HUVEC (Redpath et al. 2014). Une étude, utilisant un modèle de fibres musculaires de souris transgéniques, a montré que, suite à un dommage par irradiation laser, les molécules de dysferline insérées dans le sarcolemme sont recrutées au niveau du site de rupture (McDade, Archambeau, et Michele 2014). Une partie des dysferlines du sarcolemme est alors endocytée, dans la minute suivant l'irradiation. Il a été suggéré que le variant de dysferline soit endocyté suite à une rupture de la membrane puis dégradé par les calpaïnes pour être recyclé sous forme de mini-dysferline_{c72} au niveau du site de rupture, où il s'associerait avec la dysferline. Ainsi, la (les) fonction(s) de la dysferline pourrait être modulé(es) par des clivages enzymatiques.

La dysferline interagit avec de nombreux composants de la machinerie protéique de réparation membranaire, tels que la cavéoline-3 (C. Matsuda et al. 2001), les AnxA1 et A2 (Lennon et al. 2003), l'affixine, AHNAK (Huang et al. 2007) et MG53 (Cai, Weisleder, Ko, Komazaki, et al. 2009a). La mise en évidence de ces interactions a fait apparaître dans la littérature la notion de complexe protéique associé à la dysferline. Il a été montré que l'AnxA1, la dysferline, la caveoline-3 et MG53 sont présentes au niveau des tubules-T du sarcolemme des fibres musculaires (Waddell et al. 2011). La dysferline jouerait un rôle clé dans la formation de ces complexes (Klinge et al. 2010). Récemment, il a également été montré que la dysferline peut se dimériser *in vitro* et *in vivo*, par interaction de différents domaines C2 (Xu et al. 2011). L'importance de la formation de ces dimères dans la biologie de la cellule et la réparation membranaire reste à découvrir.

-Les Protéines Kinases C (PKC) : Les PKC forment une famille de sérine/thréonine kinases impliquées dans de nombreuses voies de signalisation dépendantes de protéines G ou de facteurs de croissance. Il existe 10 isoformes de PKC réparties en 3 groupes selon leur structure générale (**Figure 1.38**). Les PKC conventionnelles (**Figure 1.38, cPKC**) possèdent un domaine C2, les nouvelles PKC (**Figure 1.38, nPKC**) possèdent un domaine de structure très similaire aux domaines C2, mais qui en plus l'attachement aux phosphotyrosines. Enfin les PKC atypiques (**Figure 1.38, aPKC**) sont dépourvues de domaine C2.

Les protéines de cette famille ont toutes un domaine régulateur qui leur permettent de se fixer à des membranes lipidiques ou protéines cibles via leurs régions C1 et/ou C2/PB1. Elles possèdent également un domaine kinase qui leur permet de phosphoryler des protéines cibles pour l'activation de voies de signalisation.

Comme les autres protéines à domaine C2, leur liaison aux cibles n'est pas toujours dépendante de la présence de Ca^{2+} . Elles peuvent avoir des affinités pour plusieurs lipides membranaires différents (DAG, acide arachidonique, céramides, etc).

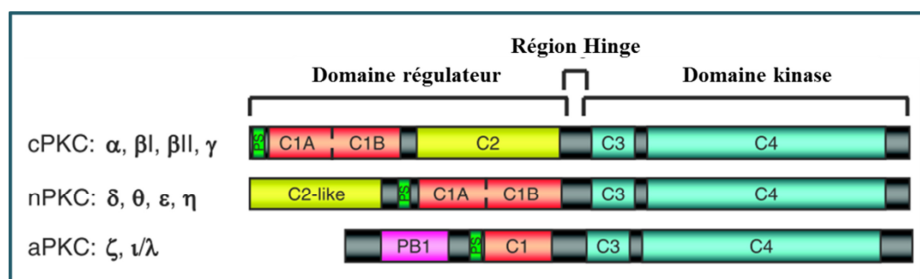


Figure 1.38 : Représentation schématique des différentes isoformes de Protéine Kinase C.

Les protéines kinases C (PKC) forment une famille de sérine/thréonine kinases. Il existe 10 isoformes de PKC réparties en 3 groupes selon leur structure générale. Les PKC conventionnelles (**cPKC**) possèdent un domaine C2. Les nouvelles PKC (**nPKC**) possèdent un domaine de structure très similaire aux domaines C2 classiques, mais qui sert de module d'attachement aux phosphotyrosines. Les PKC atypiques sont (**aPKC**) dépourvues de domaine C2. Elles possèdent toutes un domaine régulateur leur permettant de se fixer à des membranes lipidiques ou protéines cibles, via leurs régions C1 et/ou C2/PB1. Elles possèdent aussi un domaine kinase qui leur permet de phosphoryler les protéines cibles. Ces enzymes peuvent se lier aux membranes de différentes organelles dont la membrane plasmique et la membrane des saccules golgiennes. Figure adaptée de (Steinberg 2008)

Ces enzymes peuvent se lier aux membranes de différentes organelles dont la membrane plasmique et la membrane des saccules golgiennes (Steinberg 2008).

L'implication de ces protéines dans la réparation membranaire a été réalisée dans un contexte particulier (Togo et al. 1999). Il a été montré, pour la lignée murine 3T3, que la réparation membranaire était plus rapide lors d'un second dommage de la membrane plasmique. Cette facilitation de la réparation, après deux ruptures successives sur le même site membranaire, est abolie en présence d'inhibiteurs des PKC (bisindolylmaleimide) ou par un perturbateur du trafic golgien (brefeldine A). A l'inverse, l'utilisation de stimulateur des voies PKC (esters de phorbol) facilite la réparation membranaire lors d'une première rupture. Cette capacité de réparation est abolie en présence de brefeldine A et suggère que des voies de signalisation dépendantes des PKC et des vésicules golgiennes peuvent exister pour la réparation de ruptures mécaniques de la membrane plasmique.

-Les calpaïnes : Les calpaïnes forment une grande famille de protéases intracellulaires dépendantes du Ca^{2+} et qui possèdent une cystéine réactive. Elles sont présentes dans la plupart des cellules eucaryotes et quelques bactéries (Ono et Sorimachi 2012). Ces protéases ont toutes en commun la présence d'un domaine appelé CysPc et sont séparées en 2 grands groupes selon leur structure générale : les calpaïnes conventionnelles (**Figure 1.39**) et les calpaïnes non conventionnelles. Les calpaïnes conventionnelles possèdent toutes un domaine homologue aux domaines C2 ainsi qu'un domaine de liaison au Ca^{2+} de type EF-hand. Elles fonctionnent en tant qu'hétérodimère par liaison de la sous-unité catalytique à la petite sous-unité régulatrice nommée CAPNS1. Chez l'Homme, 9 des 15 gènes calpaïnes codent pour des calpaïnes conventionnelles. Les calpaïnes conventionnelles se différencient par la structure de la grande sous-unité catalytique (**Figure 1.39**). La calpaïne-1 (ou μ) et la calpaïne-2 (ou m)

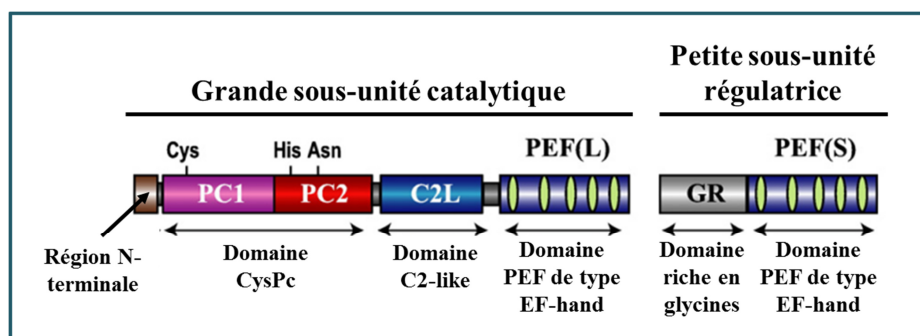


Figure 1.39 : Structure générale des calpaïnes conventionnelles. Ces protéases ont toutes en commun la présence d'un domaine appelé CysPc. Les calpaïnes conventionnelles possèdent toutes un domaine homologue aux domaines C2 ainsi qu'un domaine de liaison au Ca^{2+} de type EF-hand (PEF(L)). Elles fonctionnent en tant qu'hétérodimère en se liant à une petite sous-unité régulatrice nommée CAPNS1. Parmi ces calpaïnes conventionnelles, la structure de la grande sous-unité catalytique permet de caractériser : la calpaïne-1 (ou μ), la calpaïne-2 (ou m) qui sont exprimées de manière ubiquitaire et la calpaïne-3 (ou p94), qui est retrouvée spécifiquement dans le tissu musculaire strié squelettique. Figure adaptée de (Ono et Sorimachi 2012).

sont exprimées de manière ubiquitaire. La calpaïne-3 (ou p94) est retrouvée spécifiquement dans le tissu musculaire strié squelettique. Le défaut d'expression de la calpaïne-3 est à l'origine de la plus fréquente des dystrophies musculaires des ceintures dans le monde, nommée LGMD2A. La LGMD2A semble être la conséquence d'un défaut de remodelage des sarcomères (Huang et al. 2008). Les calpaïnes ne dégradent pas nécessairement leurs protéines cibles, mais peuvent, via leur activité protéolytique, activer, inhiber ou altérer l'activité de leurs protéines cibles (Ono et Sorimachi 2012). A titre d'exemple, la calpaïne-3 joue un rôle de régulateur de l'assemblage, du renouvellement et de la maintenance des sarcomères en dégradant les protéines sarcomériques endommagées durant la contraction (Beckmann et Spencer 2008). Elle interagit avec la dystrophine, mais aussi avec des protéines impliquées dans la réparation membranaire : les Anx, la dysferline (Huang et al. 2005) (Huang et al. 2007) ou encore AHNAK. Le clivage d'AHNAK par la calpaïne-3 entraîne une perte d'affinité pour la dysferline et la myoferline (Huang et al. 2008). Le rôle des calpaïnes dans la réparation membranaire a initialement été mis en évidence pour des neurones, par désassemblage du cytosquelette (Xie et Barrett 1991). Des fibroblastes murins, knock-out pour le gène codant la petite sous-unité régulatrice CAPNS1, sont également incapables de réparer des dégâts mécaniques de leur membrane plasmique (Mellgren et al. 2007). De même, l'inhibition de l'activité des calpaïnes par la calpeptine inhibe d'environ 50% la proportion des fibroblastes sauvages survivant aux ruptures. La présence dans le milieu extracellulaire de calpaïne-1 humaine ou calpaïne-2 bovine recombinantes restaure, en présence de Ca^{2+} , la capacité de ces cellules à réparer leur membrane plasmique lésée. Lors d'une lésion membranaire, les auteurs ont observé un recrutement des calpaïnes, associé à une dégradation rapide de la vimentine et taline, suggérant que les calpaïnes 1 et 2 joueraient un rôle dans la réparation membranaire en promouvant le remodelage du cytosquelette. En revanche, il a été montré que la calpaïne-3 n'est pas impliquée dans la formation de la mini-dysferline_{c72},

élément important de la réparation membranaire du sarcolemme (Lek et al. 2013). Les calpaïnes pourraient donc jouer un rôle important dans la réparation membranaire par leur activité protéolytique sur différents substrats. Leur action sur le cytosquelette au niveau de la zone de rupture membranaire pourrait diminuer la tension de surface de la membrane plasmique et créer un espace d'accès à la machinerie de réparation. Elles pourraient également faciliter le remodelage du cytosquelette après réparation et assurer la survie des cellules après réparation de la membrane plasmique, en éliminant les composants cellulaires dégradés lors du dommage.

B3.b2-Les protéines à domaine de liaison au Ca^{2+} de type « EF-hand » :

Le motif protéique de type EF-hand est le motif de liaison au Ca^{2+} le plus représenté chez l'Homme (Anita Lewit-Bentley et Réty 2000). Le terme EF-Hand a été proposé en 1973 pour décrire le domaine de liaison au Ca^{2+} de la parvalbumine (Yáñez, Gil-Longo, et Campos-Toimil 2012). Le motif EF-hand classique est un motif de type hélice-boucle-hélice comprenant deux hélices- α perpendiculaires l'une à l'autre (**Figure 1.40**) et séparées par une boucle de 12 acides aminés.

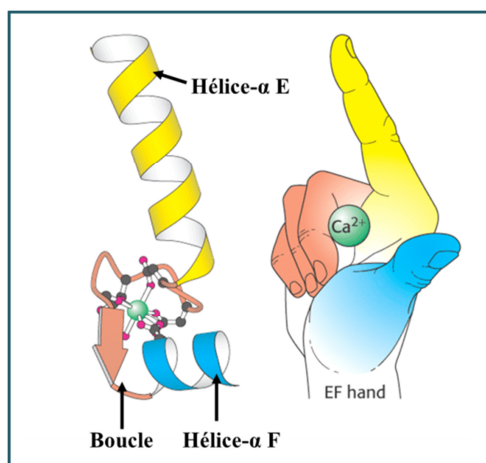


Figure 1.40 : Représentation schématique de la conformation d'un motif de type « E-F hand ». Le motif EF-hand classique est un motif de type hélice-boucle-hélice comprenant 2 hélices- α (E et F) perpendiculaire l'une à l'autre, séparées par une boucle de 12 acides aminés de long. Il a été souvent proposé pour le décrire l'analogie avec la main, où le pouce et l'index sont placés perpendiculairement l'un de l'autre. Le Ca^{2+} se lie dans une zone correspondant à l'espace entre le majeur plié et l'index déplié. Les motifs de type EF-hand peuvent avoir une affinité pour les ions calcium et magnésium et sont généralement disposés dans les protéines en motifs répétés adjacents et le plus souvent par paires. Figure adaptée de (Berg et al. 2002).

L'analogie de la main, où le pouce et l'index sont placés perpendiculairement l'un de l'autre est souvent utilisée pour décrire la structure de ce motif. Le Ca^{2+} se lie à une zone correspondant à l'espace entre le majeur plié et l'index déplié (**Figure 1.40**).

Les motifs de type EF-hand peuvent avoir une affinité pour les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , et sont généralement répétés, le plus souvent par paires. A titre d'exemple, la calmoduline et la troponine C possèdent 4 motifs de type EF-hand adjacents. Les calpaïnes possèdent également des motifs de type EF-hand, en plus de leur domaine C2.

-ALG-2 : ALG-2 est une protéine codée par le gène « Apoptosis Linked Gene », qui contient cinq motifs de liaison au Ca^{2+} de type EF-hand. Sa liaison au Ca^{2+} entraîne des changements

conformationnels lui permettant d'interagir avec des protéines riches en proline, dont certaines Anx, et des protéines du complexe ESCRT (Odorizzi 2006). Il a été établi qu'ALG-2 permet le recrutement et l'assemblage séquentiel du complexe protéique ESCRT-III. Le knock-down de ALG-2 dans des cellules de la lignée humaine Hela provoque l'incapacité des cellules à survivre à une rupture de la membrane plasmique induite par irradiation laser (Scheffer et al. 2014). Les auteurs ont proposé que suite à l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, l'activation d'ALG-2 facilite le recrutement d'Alix pour permettre l'assemblage d'un complexe ESCRT-III. Ce complexe déforme la membrane plasmique pour créer des bourgeons permettant l'élimination de la membrane plasmique lésée.

-Les protéines de la famille S100 : Les protéines S100 forment une famille de 24 membres retrouvés spécifiquement chez les vertébrés. Elles sont divisées en 3 sous-groupes suivant leurs cibles. On distingue le groupe des protéines ayant seulement des effets intracellulaires, celui des protéines ayant des effets intra- et extracellulaires et le groupe ayant des effets extracellulaires. Les protéines sécrétées ou relarguées dans le milieu extracellulaire peuvent agir comme molécule de signalisation autocrine ou paracrine. Chaque protéine S100 est le plus souvent tissu-spécifique. Les protéines S100 peuvent aussi être spécifiquement exprimées dans des pathologies, comme pour certaines formes de cancer. Par interaction avec une grande diversité de molécules, les protéines S100 exercent leur fonction dans une pléthore de processus physiologiques dont la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'homéostasie calcique, le métabolisme énergétique, l'inflammation, etc (Donato et al. 2013).

La protéine S100A11 est une protéine surexprimée dans de nombreux cancers métastatiques (Shankar et al. 2010). Il a été montré pour la lignée tumorale de cancer mammaire MCF7 que l'induction d'un phénotype invasif, par expression ectopique de la protéine erbB2, est associé à une augmentation de l'expression des protéines S100A11 et AnxA2 (Jaiswal et al. 2014). Les auteurs ont montré que cette protéine est retrouvée au site de rupture de la membrane plasmique pour 8% des cellules MCF7 contrôles, non invasives, et pour 40% des cellules MCF7 invasives. Après dommage membranaire, la mortalité des cellules MCF7 déficientes en S100A11 est multipliée par 10, en comparaison à des cellules contrôles. Les auteurs ont montré que, suite à la rupture de la membrane plasmique, la protéine S100A11 et l'AnxA2 co-localisent au niveau du site de rupture. La mutation de S100A11 inhibant sa capacité de liaison au Ca^{2+} et à l'AnxA2, empêche son recrutement au site de rupture et inhibe la capacité des cellules à réparer des lésions membranaires.

L'ensemble de ces résultats ont permis de proposer un mécanisme d'action de la protéine S100A11 dans la réparation membranaire (**Figure 1.41**). L'entrée de Ca^{2+} extracellulaire consécutif à une rupture entraîne l'activation de la protéine S100A11, qui change de conformation et s'associe à l'AnxA2 pour former des hétérotétramères (**Figure 1.41, 2**). Elle permet également le recrutement d'AnxA1 à la membrane plasmique lésée. L'augmentation de la concentration locale du Ca^{2+} provoque une accumulation des complexes S100A11/AnxA2 et une dépolymérisation de l'actine corticale à proximité du site de rupture (**Figure 1.41, 3**). Cette dépolymérisation du cytosquelette entraîne une déstabilisation

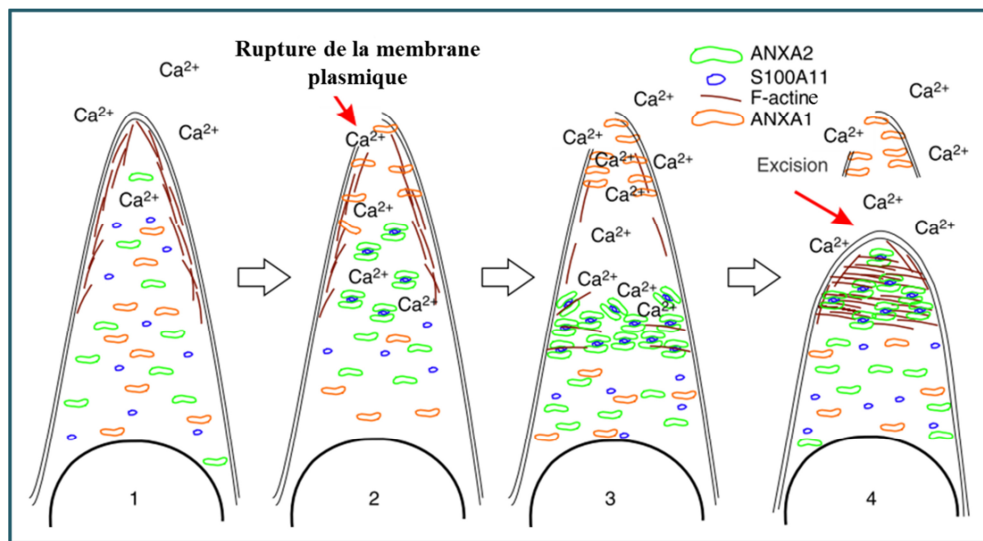


Figure 1.41 : Représentation schématisée du mécanisme d'action de la protéine S100A11 dans la réparation membranaire de la lignée tumorale mammaire MCF7. (1) Cellule intacte. (2) L'entrée de Ca^{2+} extracellulaire suite à une lésion membranaire entraîne l'activation de la protéine S100A11, qui change de conformation. Elle forme des hétérotétramères avec l'AnxA2 et permet le recrutement d'AnxA1 à la membrane plasmique lésée. (3) L'augmentation de la concentration locale du Ca^{2+} provoque une accumulation de complexes S100A11/AnxA2 et une dépolymérisation de l'actine corticale à proximité du site de rupture. (4) Cette dépolymérisation du cytosquelette entraîne une déstabilisation importante de la membrane plasmique entourant le site de rupture qui facilite son élimination. Les complexes S100A11/AnxA2 stimulent alors la repolymérisation du cytosquelette permettant la constriction du site membranaire endommagé et facilitant la fermeture complète de la membrane endommagée. Figure adaptée de (Jaiswal et al. 2014).

importante de la membrane plasmique entourant le site de rupture et facilite son élimination. Les complexes S100A11/AnxA2 stimulent alors la repolymérisation du cytosquelette permettant la constriction du site membranaire endommagé et facilitant la fermeture complète de la membrane endommagée (**Figure 1.41, 4**).

B3.b3-Les Annexines :

Les Annexines (Anx) forment une superfamille de protéines très répandue et conservée dans le monde du vivant. Ces protéines, cytosoliques pour la plupart, sont très représentées dans les cellules. Leurs propriétés de liaison aux membranes biologiques en présence de Ca^{2+} , ainsi que leur implication dans de nombreuses fonctions en relation avec les membranes, en ont fait d'excellents candidats en tant qu'acteurs majeurs de la réparation membranaire.

Une étude réalisée au laboratoire sur des cellules péryvasculaires murines, a montré, qu'après rupture mécanique, l'AnxA5 se lie aux bords de la zone de rupture où elle s'auto-assemble en réseau bidimensionnel. L'équipe a proposé l'hypothèse que le réseau d'AnxA5 empêche l'expansion de la rupture en s'opposant aux tensions exercées par le cytosquelette cortical et favorise la réparation membranaire (Bouter et al. 2011). Fort de ces résultats et sur la base d'études réalisées avec d'autres Anx par plusieurs équipes dans le monde, nous proposons

Introduction

l'hypothèse que les Anx orchestrent de manière concertée la machinerie de réparation membranaire en protégeant les cellules contre les effets directs et collatéraux d'une rupture de la membrane plasmique.

Les Anx, et particulièrement l'AnxA5, étant au cœur de ce travail, un chapitre à part leur est consacré.

Chapitre n°2 : Les Annexines

A. Présentation générale de la superfamille des Annexines :

Les Anx constituent une superfamille de protéines présentes chez la plupart des eucaryotes à l'exception des levures, mais absentes chez les bactéries (Moss et Morgan 2004). Elles ont été découvertes il y a plus de 35 ans. La première Anx isolée de cellules chromaffines des glandes surrénales de bœuf, maintenant connue sous le nom d'AnxA7, a été montrée comme jouant un rôle dans la fusion de granules isolés en présence de Ca^{2+} (Creutz, Pazoles, et Pollard 1978). La présence d'au moins 4 domaines répétés, qui constituent le motif de liaison aux membranes, caractérise les Anx. Le fait que des membres de cette famille soient présents chez des protistes implique que les premiers membres de cette superfamille seraient apparus chez un ancêtre commun il y a environ 2 milliards d'années (Weiland et al. 2005) (Hedges 2002). Un gène homologue codant pour un seul domaine a été aussi identifié chez la bactérie *Cytophaga hutchinsonii* (R. O. Morgan et al. 2006) et pourrait indiquer une origine plus ancienne de ces protéines. Plus de 500 membres de cette superfamille ont actuellement été identifiés et répartis dans de nombreuses espèces (Rescher et Gerke 2004).

Des études phylogénétiques ont permis de regrouper tous ces membres en cinq familles appelées AnxA à AnxE. La famille A est composée des Anx retrouvées chez les vertébrés, la famille des AnxB regroupe les Anx retrouvées chez les invertébrés, la famille des AnxC regroupe les Anx présentes chez les mycètes et organismes apparentés et les familles des AnxD et E regroupent les Anx retrouvées chez les plantes et les protistes, respectivement (Moss et Morgan 2004). Chez l'Homme, 12 ont été identifiées et nommées de A1 à A13, le numéro 12 n'étant pas assigné dans la nomenclature officielle. Les Anx sont des protéines abondantes et exprimées pour la plupart de manière ubiquitaire (Gerke et Moss 2002). Par exemple, les AnxA5 et A3 ont été montrés comme pouvant représenter 2% et 1% de la masse protéique totale des cellules humaines HFF et neutrophiles, respectivement (Schlaepfer et Haigler 1990) (Sopkova et al. 2002). Au sein d'une même famille, les différents membres se distinguent par les différences de séquences dans leur partie N-Terminale. Cette partie N-Terminale des Anx est responsable de leurs fonctions, avant ou après liaison aux membranes biologiques.

B. Structure et fonctions des Annexines :

Au cours des 9 premiers mois de l'année 2015, 1300 articles, contenant dans leur titre ou leur résumé le mot « Annexin », ont été publiés et référencés sur pubmed, soit une moyenne de 5 articles par jour. Les Anx sont des protéines très étudiées car elles sont impliquées dans de nombreux processus associés aux membranes. Par exemple, à l'échelle cellulaire, elles interviennent dans l'endocytose/exocytose, le transport vésiculaire, l'agrégation de vésicules, la prolifération cellulaire et l'organisation du cytosquelette. A l'échelle tissulaire, elles

interviennent dans des phénomènes comme la coagulation sanguine ou l'inflammation (Gerke et Moss 2002).

Les Anx sont des protéines solubles, qui ont la capacité de se lier aux membranes biologiques en présence de Ca^{2+} (Gerke, Creutz, et Moss 2005). Plus particulièrement, les Anx se lient aux phospholipides chargés négativement contenus dans les membranes, principalement la PS (Zachowski 1993). La liaison des Anx est optimale avec des phospholipides membranaires, puisque l'affinité de ces protéines pour des phospholipides solubilisés est vraiment très faible (Tait, Gibson, et Fujikawa 1989). *In vitro*, les Anx peuvent néanmoins se lier à d'autres phospholipides chargés négativement que la PS (Blackwood et Ernst 1990). L'AnxA2 peut ainsi se lier au phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Il a aussi été montré que l'affinité pour les membranes de certaines Anx, comme l'AnxA1, est augmentée par la présence de phospholipides non chargés tels que les céramides (Eduard B. Babiychuk, Monastyrskaya, et Draeger 2008). Dans des conditions très particulières, sur des membranes modèles il a été montré que certaines Anx, comme l'AnxA5, peuvent se lier à des membranes composées uniquement de phospholipides non chargés comme la PC (Richter et al. 2005). Les Anx se lient aux membranes biologiques de manière réversible. Leur association/dissociation avec ces membranes dépend de la proportion de phospholipides chargés négativement et est entièrement contrôlée par la concentration en Ca^{2+} dans le milieu (Pigault et al. 1994). Cette dépendance au Ca^{2+} est partagée par d'autres familles de protéines comme les facteurs de la coagulation, certaines protéines kinases ou les phospholipases (Lemmon 2008). Les Anx se distinguent de ces autres familles de protéines par leur structure de liaison aux membranes ainsi que leur site de liaison au Ca^{2+} .

B1. Structure des Annexines

Les Anx sont toutes caractérisées par la présence dans leur partie C-Terminale, d'un module hautement conservé et constitué de 4 répétitions d'une séquence d'environ 70 acides aminés, appelé domaine Anx (**Figure 2.1**). L'AnxA5 fut la première Anx cristallisée, dont la structure a été résolue (Huber, Römisch, et Paques 1990). Depuis la structure tridimensionnelle d'autres Anx a été obtenue (Swairjo et Seaton 1994). Ces études ont montré qu'un domaine Anx est une structure compacte composée de 5 hélices- α reliées par des petites boucles, contenant les sites de liaison du Ca^{2+} (**Figure 2.1, représentation 3D**). L'interaction aux membranes est réalisée par l'intermédiaire des ions Ca^{2+} . La disposition spatiale des 4 domaines forme le module de liaison aux membranes. Il présente la forme d'un rhomboïde faiblement incurvé, dont la face convexe lie les membranes via un pont électrostatique entre les ions Ca^{2+} et les têtes polaires des phospholipides (**Figure 2.1, représentation schématique**). La partie concave fait alors face à la partie N-Terminale. L'AnxA6 est un membre à part, puisqu'elle est la seule à contenir huit domaines Anx, répartis en 2 modules de liaison aux membranes.

Les Anx constituent la seconde famille de protéines liant le Ca^{2+} dont la structure cristallographique ait été déterminée, après la famille des calmodulines (Seaton et Dedman 1998). Comparé à la calmoduline, dont le motif E-F hand possède 4 sites de liaison

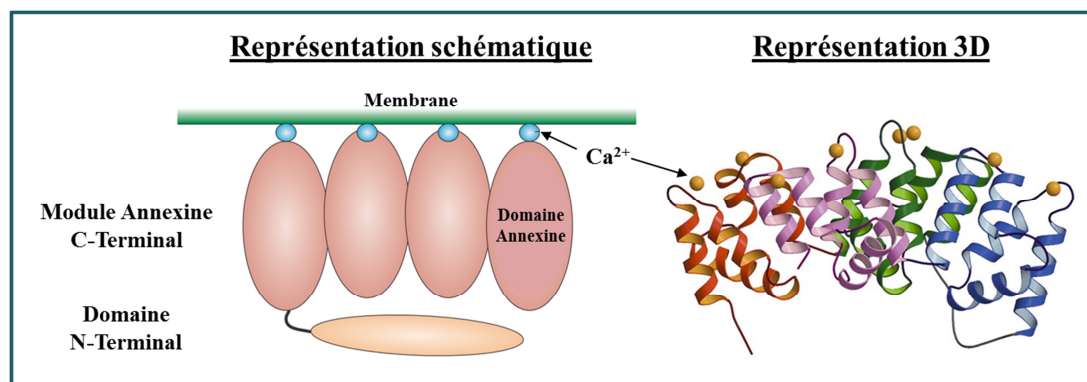


Figure 2.1 : Représentation schématique de la structure générale des Annexines en interaction avec une membrane. **Représentation schématique** : Les Anx sont composées d'un module C-Terminal de liaison aux membranes Ca^{2+} -dépendante, très conservé et d'une partie N-Terminale variable. Le module de liaison est composé de 4 répétitions de 70 acides aminés pouvant chacun lier des ions Ca^{2+} . La présence de Ca^{2+} (boules bleues) est nécessaire pour la liaison réversible aux membranes. **Représentation 3D** : Chaque domaine Anx est une structure compacte composée de 5 hélices- α reliés par des boucles. Chaque domaine est représenté par une couleur et les ions Ca^{2+} interagissant avec l'Anx sont représentés par des boules jaunes. Figures modifiées à partir de (Bouter et al. 2011) et (Rescher et Gerke 2004).

identiques au Ca^{2+} , les Anx peuvent lier en moyenne entre 10 et 12 ions Ca^{2+} (Evans et Nelsestuen 1994). Chaque domaine Anx peut effectivement lier jusqu'à 3 ions Ca^{2+} . Les sites de liaison au Ca^{2+} et aux phospholipides sont présents dans chacune des 4 répétitions (Yáñez, Gil-Longo, et Campos-Toimil 2012). Parmi les trois sites de liaison Ca^{2+} , certains sont des sites de forte affinité pour le Ca^{2+} et d'autres des sites de faible affinité. Chaque domaine Anx possède un site de forte affinité et deux sites de faible affinité. Les Anx, bien que possédant un module de liaison très conservé, ont une sensibilité au Ca^{2+} différente. Cette différence de sensibilité module la cinétique de liaison aux membranes. L'affinité intrinsèque des Anx pour le Ca^{2+} est plutôt faible (de 10^{-5} à 10^{-3}M), mais augmente d'un facteur 100, ou plus, en présence de phospholipides (Céline Raguene-Nicol 2002), (Raynal et Pollard 1994).

La constante de dissociation des Anx, associée à l'interaction membranaire, dépend de la composition phospholipidique.

Chez les mammifères, il est estimé que la quasi-totalité des PS sont situées dans le feuillet interne de la membrane plasmique (van Meer, Voelker, et Feigenson 2008), où ils représentent 15 à 20% des lipides (Adu-Gyamfi et al. 2015). La concentration calcique nécessaire pour la demi-association de l'AnxA5 à des liposomes contenant entre 18 et 20% de PS est de $200\mu\text{M}$ (Richter et al. 2005). Cette valeur passe à 2mM, lorsque la densité en PS est comprise entre 9 et 10%, et à 20mM, pour une densité comprise entre 4,5 et 5,5%.

Leur différence de sensibilité au Ca^{2+} permet une activation ciblée des différentes Anx en réponse aux changements cytosoliques et membranaires (Gerke, Creutz, et Moss 2005), (Raynal et Pollard 1994).

Par exemple, il a été montré dans des cellules murines de la lignée NE-115 que l'élévation intracellulaire de la concentration en Ca^{2+} entraîne un recrutement séquentiel des différentes Anx. L'AnxA2 est la première Anx recrutée à la membrane plasmique et à l'enveloppe nucléaire, suivie environ 30 secondes plus tard par l'AnxA4, puis par l'AnxA6, l'AnxA1 et

enfin l'AnxA5 (Skrahina, Piljić, et Schultz 2008). D'autres études, dans d'autres contextes cellulaires, ont montré des cinétiques différentes ($A2 > A6 > A4 > A1$ (Monastyrskaya et al. 2007) ; $A2 > A1 > A6 > A4 > A5$ (Schlaepfer et Haigler 1987), probablement associées aux différences de composition membranaire.

Bien que non indispensable pour la liaison aux membranes biologique, la région N-Terminale participe à la stabilité de la structure des Anx (Arboledas et al. 1997) (Lizarbe et al. 2013). Des études structurales ont montré, pour plusieurs Anx, l'existence de 2 conformations avec une forme en absence de Ca^{2+} et une forme en présence Ca^{2+} (Concha et al. 1993), (Sopkova et al. 2002), (Rosengarth et Luecke 2003). Les changements de conformation sont remarquables pour les Anx dont la région N-Terminale est étendue, telle que l'AnxA1 (**Figure 2.2**). La partie N-Terminale de l'AnxA1 est enchâssée dans le module de liaison aux membranes, en absence Ca^{2+} (**Figure 2.2, Forme non liée au Ca^{2+}**).

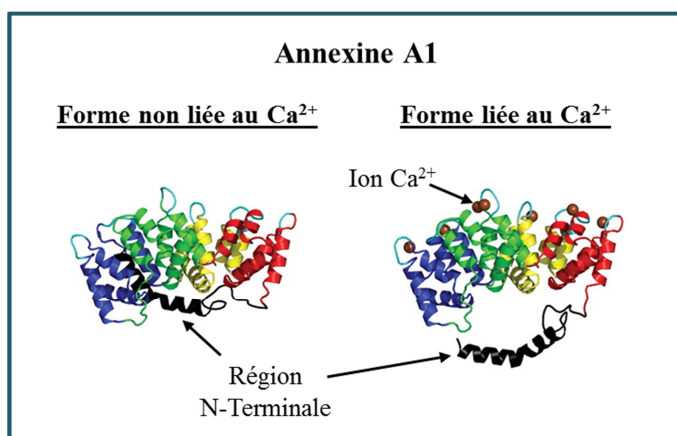


Figure 2.2 : Représentation 3D du changement conformationnel de l'Annexine-A1 après liaison au Ca^{2+} . En absence de Ca^{2+} , la région N-Terminale qui forme une structure secondaire de type hélice- α est enchâssée dans le module de liaison aux membranes lipidiques (forme non liée au Ca^{2+}). La liaison du Ca^{2+} entraîne le changement de conformation des sites de liaison au Ca^{2+} puis de toute la structure qui provoque la sortie de la partie N-Terminale du module de liaison et son exposition dans le milieu environnant. Figure modifiée de (Shesham, Bartolotti, et Li 2008).

La liaison au Ca^{2+} entraîne une modification globale de la conformation protéique, aboutissant à la sortie de la partie N-Terminale du module de liaison et son exposition dans l'environnement (**Figure 2.2, Forme liée au Ca^{2+}**) (Rosengarth et Luecke 2003). Il a été proposé que l'exposition du domaine N-Terminal après liaison du Ca^{2+} permet son interaction avec d'autres protéines ou composants cellulaires, faisant de l'Anx liée au Ca^{2+} une forme activée d'Anx (A. Lewit-Bentley et al. 1992), (Gerke et Moss 2002).

B2. Fonctions des Annexines

La partie N-Terminale des Anx est très variable, non seulement en composition, mais aussi en taille. Chez l'Homme, sa taille varie de quelques résidus à plus de 200 (Lizarbe et al. 2013). Sur la base de ce critère, les Anx ont été classées en 3 groupes : 1) les membres avec une queue de taille inférieure à 21 acides aminés (A3-A5, A8, A10 et l'isoforme A13a), 2) les membres avec une queue de taille supérieure à 55 acides aminés (A1, A2, A9 et l'isoforme A13b) et 3) les membres avec une queue de taille supérieure à 100 acides aminés (A7 et A11).

Ces domaines sont responsables des fonctions que jouent chacune des Anx. Leur rôle repose sur les interactions entre leur domaine N-Terminal et différentes protéines. Il repose également sur des modifications post-traductionnelles et/ou des modifications enzymatiques spécifiques. Par exemple, les régions N-Terminales des deux isoformes d'AnxA13 possèdent des sites de miristoylation. Les AnxA1 et A2 peuvent être phosphorylées par des kinases, comme la PKC- α ou les PKA, par des récepteurs d'hormones de croissance ou par des kinases virales (pp60src) (Gerke et Moss 2002). Les domaines N-Terminaux fonctionnent en fait comme des régions régulatrices. Des modifications variées de ces domaines peuvent avoir des conséquences différentes sur les propriétés physicochimiques des Anx, et moduler leur fonction. Par exemple, l'AnxA2 possède plusieurs sites de phosphorylation. Il a été montré que la phosphorylation d'une tyrosine en position 23 réduit son affinité pour des vésicules phospholipidiques ou inhibe sa liaison avec l'actine-F. En revanche, la phosphorylation d'une sérine en position 25 n'affecte pas son affinité pour ces vésicules (Bharadwaj et al. 2013). Par ailleurs, la phosphorylation d'une sérine en position 11 réduit son affinité pour la protéine S100A10 et entraîne la dissociation de l'hétérotétramère AnxA2/S100A10. La partie N-Terminal des AnxA1, A2 et A8 est sensible à la protéolyse. Chez les neutrophiles humains, l'AnxA1 est clivée par une métallo-protéase, modifiant la nature des granules avec lesquels elle interagit (Movitz, Sjölin, et Dahlgren 1999). La phosphorylation de la tyrosine 21 augmente sa susceptibilité au clivage alors que la glycosylation d'un résidu asparagine en position 42 rend l'AnxA1 résistante à la protéolyse.

Si la plupart des Anx sont exprimées de façon ubiquitaire, certaines ont un profil d'expression tissu-spécifique : l'AnxA3 dans les neutrophiles et l'AnxA8 dans les cellules placentaires et épithéliales, par exemple (Gerke et Moss 2002). Dans les cellules, les Anx ont une distribution généralement cytoplasmique et peuvent être parfois retrouvées associées à la membrane plasmique (Boczonadi et Määttä 2012). Certaines Anx comme l'AnxA5 bien que dépourvues de signal de localisation nucléaire connu sont localisées à la fois dans le cytosol et le noyau (J. L. Barwise et Walker 1996). La localisation nucléaire de l'AnxA5 semble dépendre du stade de division des cellules en culture et, plus particulièrement, de la présence dans le milieu extracellulaire de facteurs de croissance, dont l'effet sur les cellules est médié par des récepteurs à activité tyrosine kinase (Jennifer L. Barwise et Walker 1996) (Mohiti, Caswell, et Walker 1997). A l'heure actuelle, la signification biologique de la présence de ces protéines dans le noyau, et la manière dont leur localisation est régulée, reste un mystère. La possibilité de l'existence de séquence(s) signal de localisation nucléaire (NLS) encore inconnues peut être envisagé. L'interaction du domaine N-Terminal des Anx avec d'autres protéines module aussi la localisation subcellulaire de ces protéines. Au même titre que l'AnxA5, l'AnxA2 transite entre les compartiments nucléaires et cytosoliques. Des expériences ont montré que le traitement des cellules avec la leptomycine B, un inhibiteur de l'export nucléaire, bloque l'AnxA2 dans le noyau des cellules suggérant que cette protéine contient dans sa séquence au moins un NLS (Eberhard et al. 2001). Comme le traitement à la leptomycine B n'affecte pas la distribution purement cytosolique de l'hétérotétramère

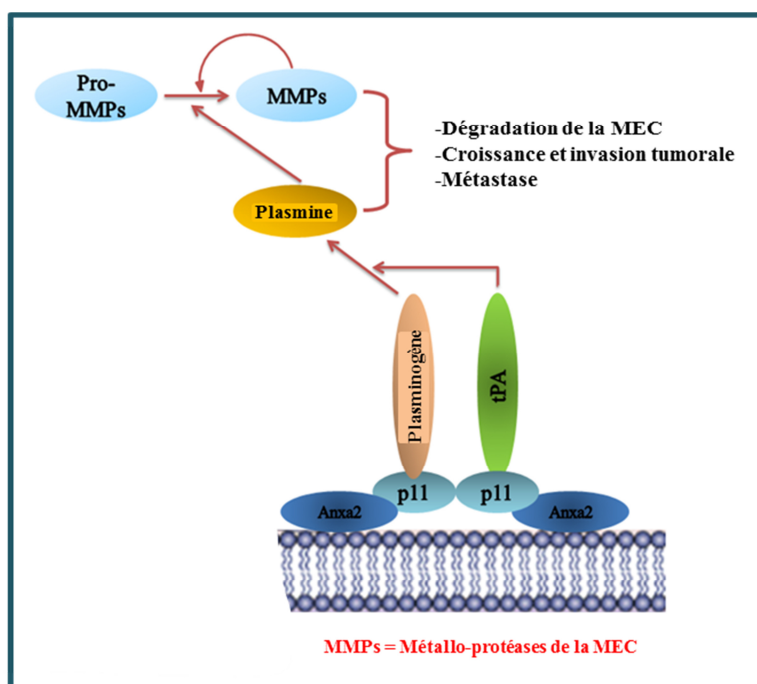
AnxA2/S100A10, il a été proposé que la liaison de la protéine S100A10 à la partie N-Terminale de l'AnxA2 masque les NLS putatifs et cause sa rétention dans le cytosol

Malgré l'absence dans leur séquence de peptide signal de sécrétion, certaines Anx ont été décrites comme présentes dans le milieu extracellulaire (Römisch et al. 1992) (Kaneko et al. 1996), (Masuda et al. 2004), (Gerke et Moss 2002). Le(s) mécanisme(s) à l'origine de la présence d'Anx à l'extérieur des cellules reste(nt) également un mystère. Leur présence pourrait être due à l'existence de voies de sécrétion non conventionnelles indépendantes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, comme il a été proposé pour d'autres protéines, telle que l'interleukine-1 β (Qu et al. 2007). La présence de ces Anx dans le compartiment extracellulaire pourrait être également le résultat d'un relargage passif par des cellules nécrotiques dont la membrane plasmique est gravement altérée.

Les Anx extracellulaires semblent jouer des rôles importants dans de nombreuses fonctions physiologiques. Les fonctions les mieux définies actuellement concernent les AnxA1, A2 et A5, qui présentent des activités anti-inflammatoires, pro-fibrinolytiques et anti-thrombotiques, respectivement (D'Acquisto, Perretti, et Flower 2008) (Ling et al. 2004) (Rand et Wu 2004). Il a été montré que les traitements à base de glucocorticoïdes entraînent une augmentation de l'expression de l'AnxA1 dans de nombreuses cellules (Comera et Russomarie 1995) et que l'injection de cette protéine à des souris modèles a des propriétés anti-inflammatoires. Les mécanismes responsables de ces propriétés anti-inflammatoires de l'AnxA1 extracellulaire ne sont pas encore bien compris. Il est proposé que l'AnxA1 interfère avec le recrutement, la migration et l'activation des granulocytes neutrophiles et inhiberait la voie adaptative des lymphocytes TH2. *In vitro*, il a ainsi été montré que sa présence dans le milieu extracellulaire promeut l'apoptose des neutrophiles, leur phagocytose et inhibe la différenciation des lymphocytes T en Th2 (D'Acquisto, Perretti, et Flower 2008).

Les récepteurs au plasminogène sont essentiels à la régulation de l'activation de la plasmine, une enzyme peptidase, à la surface des cellules. Le plasminogène inactif est activé en plasminogène actif par des activateurs tels que l'activateur de plasminogène tissulaire (tPA) ou l'activateur de plasminogène urokinase (uPA). L'activation de la plasmine par le plasminogène actif est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, incluant la fibrinolyse et l'invasion de cellules tumorales (Bharadwaj et al. 2013). Ces effets sont le résultat de l'activation de métallo-protéases de la matrice extracellulaire. La production de plasmine dans le milieu extracellulaire est augmentée en présence de récepteurs au plasminogène à la surface des cellules, qui immobilise le plasminogène et entraîne la mise en contact avec ses activateurs. Le rôle de l'AnxA2, en tant que régulateur de la fibrinolyse *in vivo*, a été mis en évidence dans des souris déficientes en AnxA2. Chez ces animaux, un dépôt anormal de fibrine dans les vaisseaux sanguins, ainsi qu'une clairance incomplète des artères lésées par thrombose, ont été observés (Surette et al. 2011). Une série d'expériences, utilisant des souris déficientes en S100A10 ou en AnxA2, a mis en évidence que l'AnxA2 joue un rôle dans la fibrinolyse lorsqu'elle est complexée avec la protéine S100A10 sous forme d'hétérotétramère. Dans ce modèle, l'hétérotétramère AnxA2/S100A10 est lié au feuillet externe de la membrane plasmique par l'interaction de l'AnxA2 avec les phospholipides membranaires en présence de Ca²⁺ (**Figure 2.3**).

Introduction



Figures 2.3 : Représentation schématique du rôle de l'hétérotétramère AnxA2/S100A10 dans le processus fibrinolytique. L'hétérotétramère AnxA2/S100A10 est lié au feuillet externe de la membrane plasmique par l'interaction de l'AnxA2 avec les phospholipides membranaires en présence de Ca^{2+} . La protéine S100A10 lie le plasminogène et l'activateur tissulaire du plasminogène. Cette proximité entraîne la conversion du plasminogène en plasmine. La plasmine active alors les pro-métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MEC) en métalloprotéases (MMP) actives. Ces métalloprotéases clivent les protéines qui dégradent la matrice extracellulaire en contact avec les cellules. Cette dégradation de la MEC augmente le pouvoir invasif dans le cas de cellules tumorales. Figure adaptée de (Bharadwaj et al. 2013).

La protéine S100A10 lie le plasminogène et l'activateur tissulaire du plasminogène. Cette proximité entraîne la conversion du plasminogène en plasmine. La plasmine active alors les pro-métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MEC) en métalloprotéases actives. Ces métalloprotéases clivent les protéines qui dégradent la matrice extracellulaire en contact avec les cellules. Cette dégradation de la MEC augmente le pouvoir invasif dans le cas de cellules tumorales. Dans ce modèle, l'AnxA2 sert de stabilisateur à la protéine S100A10 pour exercer son rôle de récepteur au plasminogène et au tPA. Plusieurs zones d'ombre existent dans ce modèle, notamment sur le processus de translocation du tétramère AnxA2/S100A10 du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe.

Plusieurs fonctions ont été attribuées pour l'AnxA5 extracellulaire. Elle a d'abord été décrite comme étant une protéine anticoagulante en se liant aux PS exposées à la surface des plaquettes activées ou des cellules endothéliales. Cette liaison provoquerait un encombrement stérique pour la liaison des facteurs de la coagulation.

Le syndrome antiphospholipides (SAPL) est une maladie auto-immune systémique caractérisée par la présence d'anticorps sériques anti-phospholipides, qui provoquent des événements thrombotiques ou des complications obstétricales récurrentes. Chez les patientes touchées par ce syndrome, le risque de faire une fausse couche est important. L'AnxA5 est fortement exprimée dans le tissu placentaire et a été proposée comme étant constitutivement

présente à la surface des syncytiotrophoblastes placentaires (Rand et Wu 2004). Il a été montré que l'administration d'un anticorps anti-AnxA5, par perfusion, chez des souris femelles entraîne une thrombose placentaire et un état nécrotique des embryons (X. Wang et al. 1999). Il a été proposé que l'AnxA5 à la surface des syncytiotrophoblastes placentaires, forme un bouclier anti-thrombotique, protégeant le placenta. Cette hypothèse reste encore très discutée. Plusieurs études cliniques n'ont en effet pas révélé de relation directe entre la présence d'anticorps anti-AnxA5 et des fausses couches récurrentes (Rand et Wu 2004). Les effets, sur le développement intra-utérin du placenta et des embryons, des anticorps anti-AnxA5 (de lapin) pourraient être les conséquences de l'activation de composants moléculaires et cellulaires du système immunitaire, en présence de xéno-anticorps, et non à l'inhibition de la liaison de l'AnxA5 à la surface des syncytiotrophoblastes.

Les relations étroites que peuvent établir les membres de la superfamille des Anx avec un grand nombre de protéines cellulaires et leurs implications dans un ensemble de processus essentiels à la survie des cellules rendent difficile l'interprétation des données expérimentales obtenues *in vivo*. De plus, en raison de leur propriété commune de liaison aux membranes biologiques en présence de Ca^{2+} , il n'est pas exclu que des phénomènes de compensation fonctionnelle existent lors de l'inhibition sélective d'une Anx.

Outre leurs propriétés de liaison membranaire, certaines Anx sont capables de former des auto-assemblages à la surface des membranes biologiques (Mosser et al. 1991) (Bandorowicz-Pikula 2003). Ces véritables cristaux bidimensionnels ont été observés pour les AnxA4 (Kaetzel et al. 2001), A5 (Oling, Bergsma-Schutter, et Brisson 2001) et A6 (Avila-Sakar, Creutz, et Kretsinger 1998). De manière très intéressante, des assemblages inter-membranaires ont été également observés dans le cas du dimère AnxA2/S100A10 (Lambert et al. 2004). La formation de telles structures, quasi-cristallines, est rare pour des protéines. Toutes les fonctions imputées aux Anx sont associées à la régulation de la dynamique des membranes. Il a été proposé, suite à des expériences sur bicouches lipidiques supportées, composées à 80% de DOPC et 20% de DOPS, que la formation de ces réseaux entraîne une hétérogénéité de la composition membranaire, avec la ségrégation des DOPS en nano-domaines interagissant avec l'Anx (Faiß et al. 2008). La formation des auto-assemblages d'Anx diminuerait la mobilité phospholipidique dans ces nano-domaines. L'existence *in vivo* de ces réseaux n'a pour le moment jamais été montrée. L'équipe a néanmoins mis en évidence que la forme sauvage d'AnxA5 promeut la réparation membranaire des cellules périvasculaires murines, alors qu'une forme mutée, incapable de former ce type de réseau, n'a aucun effet (Bouter et al. 2011). L'auto-assemblage semble donc être essentiel à la fonction de l'AnxA5 dans la réparation membranaire.

L'AnxA5 est la plus petite des Anx, avec une masse moléculaire d'environ 35kDa et une partie N-Terminale composée de moins de 20 acides aminés (Lizarbe et al. 2013). Elle constitue ainsi le prototype de la superfamille des Anx. Son abondance dans le placenta humain a permis d'en purifier suffisamment pour effectuer les études structurales qui ont servi à sa modélisation. Des études par cryo-microscopie électronique (Oling, Bergsma-Schutter, et Brisson 2001), microscopie à force atomique (Reviakine, Bergsma-Schutter, et Brisson 1998) et une approche corrélative de microscopie électronique à transmission et de cristallographie

des rayons X (Voges et al. 1994) ont mis en évidence la formation spontanée de cristaux-2D, par auto-assemblage de l'AnxA5, après liaison sur des membranes contenant de la PS. En présence de Ca^{2+} à une concentration de l'ordre du mM, l'AnxA5 se lie aux PS membranaires et s'auto-assemble en trimères puis en réseau 2D (Oling, Bergsma-Schutter, et Brisson 2001) (**Figure 2.4A**).

Plusieurs formes cristallines ont été observées une forme majoritaire de symétrie P6 et une forme de symétrie P3 minoritaire en conditions proches du physiologique mais dont la formation est favorisée par l'augmentation de la proportion de PS dans les membranes ou par l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} du milieu environnant (**Figure 2.4A**). Vue depuis sa face concave, l'AnxA5 possède une forme cyclique dans laquelle les domaines Anx ont une disposition spatiale par paire (I+IV) et (II+III) (**Figure 2.4B**). Les cristaux de symétrie P6 ont une structure à motifs hexagonaux, dont l'espace libre dans chaque hexagone forme un cercle d'un diamètre estimé à 9nm (**Figure 2.4C**). Il a aussi été estimé que l'AnxA5 occupe 65% de la surface totale occupée par le cristal (Bouter et al. 2011). Des projections de clichés pris en cryo-microscopie électronique montrent que la base structurale des cristaux de symétrie P6 est la formation de dimères de trimères via le domaine III (**Figure 2.4D**). Il a été montré que cette interaction entre deux monomères, via le domaine III, se fait par paire d'acides aminés de charges opposées (Mo et al. 2003). La mutation d'un seul acide aminé, entrant dans la formation de ces interactions électrostatiques, ne suffit pas à abolir l'aptitude de l'AnxA5 à s'auto-assembler en réseaux-2D. Seuls des quadruples et quintuples mutants perdent la capacité de former des auto-assemblages (Bouter et al. 2011).

C. Annexines et réparation membranaire

Les Anx constituent un senseur calcique supplémentaire dans les cellules. Seulement, à la différence d'autres senseurs comme les ferlines ou les synaptotagmines, ce sont des senseurs majoritairement cytosoliques. L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire modifie rapidement et considérablement leur localisation subcellulaire, en provoquant leur liaison aux membranes. La sensibilité au Ca^{2+} de ces protéines est modulée, soit par l'interaction avec d'autres protéines cytosoliques, soit par modification de la partie N-Terminale, comme décrit précédemment pour l'interaction de l'AnxA2 avec S100A10. Toutes les conditions sont donc réunies pour qu'elles aient des actions directes ou indirectes sur le processus de réparation de la membrane plasmique. Les Anx A1, A2, A5, A6 et A7 ont ainsi déjà été décrites, comme intervenant dans le processus de réparation, à des étapes différentes.

C1. Annexine-A1 et réparation membranaire

L'AnxA1 fut, avec l'AnxA2, l'une des premières Anx suspectées d'avoir un rôle dans la réparation membranaire (Lennon et al. 2003). Une étude sur des tissus musculaires striés squelettiques, de souris déficientes en dysferline, a montré une baisse de l'expression des

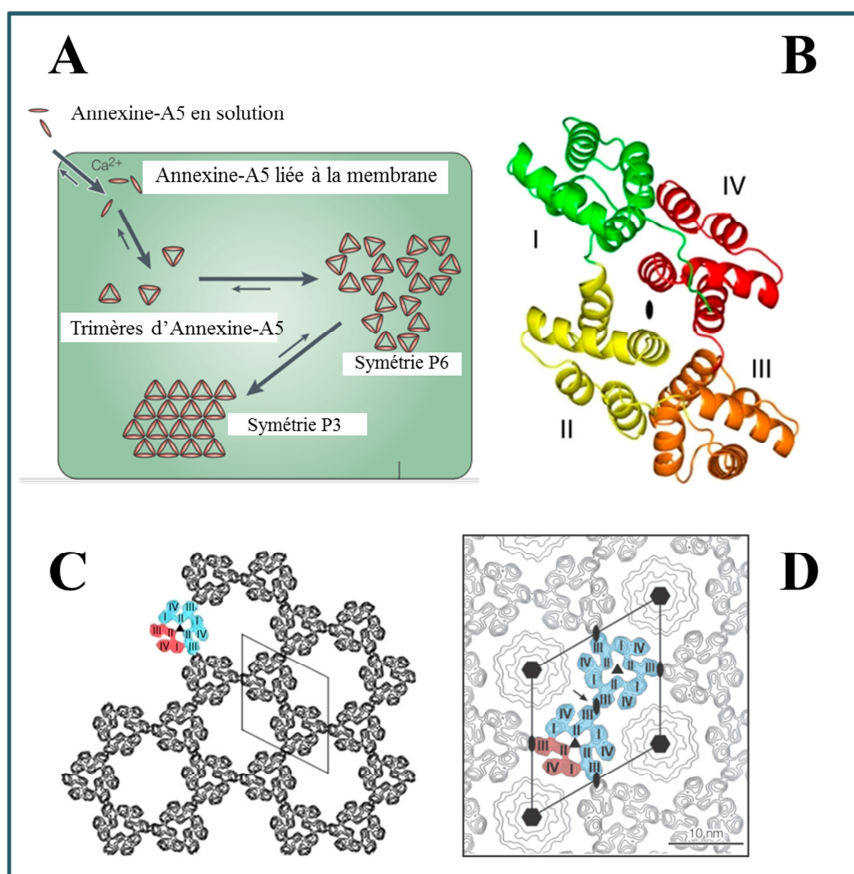


Figure 2.4 : Formation de réseaux bidimensionnels par l'Annexine-A5 après liaison aux membranes contenant de la PS en présence de mM Ca^{2+} . (A) Représentation schématique de la formation de cristaux-2D par l'AnxA5. L'AnxA5 en solution se lie aux membranes contenant des PS (support vert) en présence de Ca^{2+} . Après association, l'AnxA5 s'auto-assemble en trimères, qui s'associent pour former des réseaux-2D. Deux types de réseaux majoritaires ont été observés : les réseaux de symétrie P6 et les réseaux de symétrie P3. Les réseaux de symétrie P6 sont les réseaux majoritaires formés en condition standard mais coexistent avec les réseaux de symétrie P3. La formation de ces derniers semble être favorisée par une forte proportion de PS dans les membranes ou par l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} . (B) Représentation 3D de l'AnxA5 observée par sa face concave. Les 4 domaines Anx (numérotés de I à IV) ont une disposition spatiale par paires (I+IV) et (II+III). (C) Vue en projection d'un cristal 2D de symétrie P6. Un trimère d'AnxA5 a été coloré pour une meilleure lisibilité de la structure avec, dans le trimère, un monomère en rouge et un dimère en bleu. (D) Projection de l'association de deux trimères au sein d'un cristal de symétrie P6 à partir de clichés en microscopie électronique. L'association de deux trimères se fait via l'interaction des domaines III de deux monomères d'AnxA5 au sein de deux trimères adjacents. Barre d'échelle : 10nm.

AnxA1 et A2, en comparaison aux cellules isolées de souris sauvages. Il a également été montré que, dans ces cellules, ces deux Anx interagissent avec la dysferline. Les auteurs ont proposé que, dans les myotubes intacts, la dysferline est localisée au niveau du sarcolemme où elle co-localise avec les AnxA1 et A2 (**Figure 2.5A**). L'interaction de la dysferline avec l'AnxA2 se fait notamment au niveau des microdomaines, alors que l'interaction avec l'AnxA1 se fait dans les autres régions du sarcolemme. Dans les cellules musculaires, les AnxA1 et A2 existent aussi sous forme monomérique et hétérotétramériques avec leurs partenaires S100A10 (AnxA2) et S100A11 (AnxA1). La rupture mécanique importante du sarcolemme entraîne un

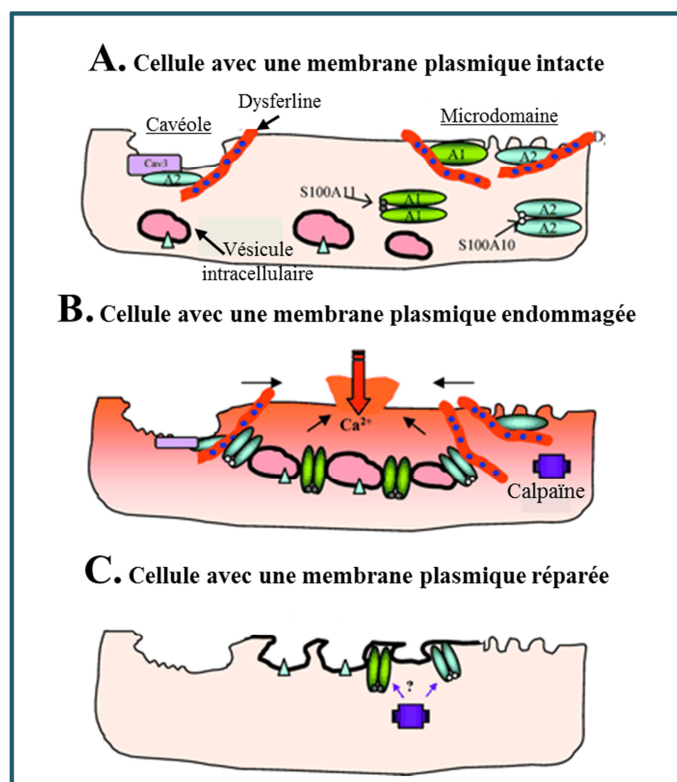


Figure 2.5 : Modèle de réparation du sarcolemme de cellules musculaires striées avec l'intervention des Annexines A1 et A2 après lésion physique du sarcolemme. (A) Dans les myotubes intacts, la dysferline est localisée dans le sarcolemme dans lequel elle co-localise avec les AnxA1 et A2. L'interaction avec l'AnxA2 se fait notamment au niveau des microdomaines de type cavéolaire ou non cavéolaire, alors que l'interaction de la dysferline avec l'AnxA1 se fait dans les autres régions. Dans les cellules les Anx existent aussi sous forme monomérique et hétérotétramérique avec leurs partenaires S100A10 (AnxA2) et S100A11 (AnxA1). (B) La rupture mécanique importante du sarcolemme entraîne un influx massif de Ca^{2+} extracellulaire qui active le processus de fusion de vésicules au niveau de la zone de rupture. L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire active les Anx qui participent à l'agrégation et au

recrutement des vésicules intracellulaire L'interaction entre le complexe AnxA2/S100A10 et la dysferline assure le recrutement du patch au site de rupture. (C) Le retour à une composition membranaire normale pourrait être lié à l'activité des calpaïnes. Schéma adapté de (Lennon et al. 2003).

influx massif de Ca^{2+} extracellulaire qui active le processus de fusion de vésicules au niveau de la zone de rupture (**Figure 2.5B**).

L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire active les Anx, qui participent alors à l'agrégation et au recrutement des vésicules intracellulaires pour la formation du « patch » lipidique. La liaison du « patch » à la membrane est assurée par interaction de la dysferline au tétramère AnxA2/S100A10. Le retour à une composition membranaire normale pourrait être lié à l'activité des protéases calpaïnes (**Figure 2.5C**). Ce modèle date de 2003 et a été complété récemment par Lek et ses collaborateurs (Lek et al. 2013). La rupture du sarcolemme et du potentiel membranaire au niveau du site de rupture seraient suivis d'un influx massif de Ca^{2+} , par le site de rupture, mais aussi par des canaux calciques voltages dépendants (CCV-D) activés au niveau de ce site (**Figure 2.6**). En quelques secondes, un pool de dysferline est clivé en mini-dysferline_{c72} par les calpaïnes (**Figure 2.6A**). Des vésicules recouvertes de mini-dysferline_{c72} sont alors recrutées. La protéine MG53 est aussi recrutée de manière indépendante du Ca^{2+} .

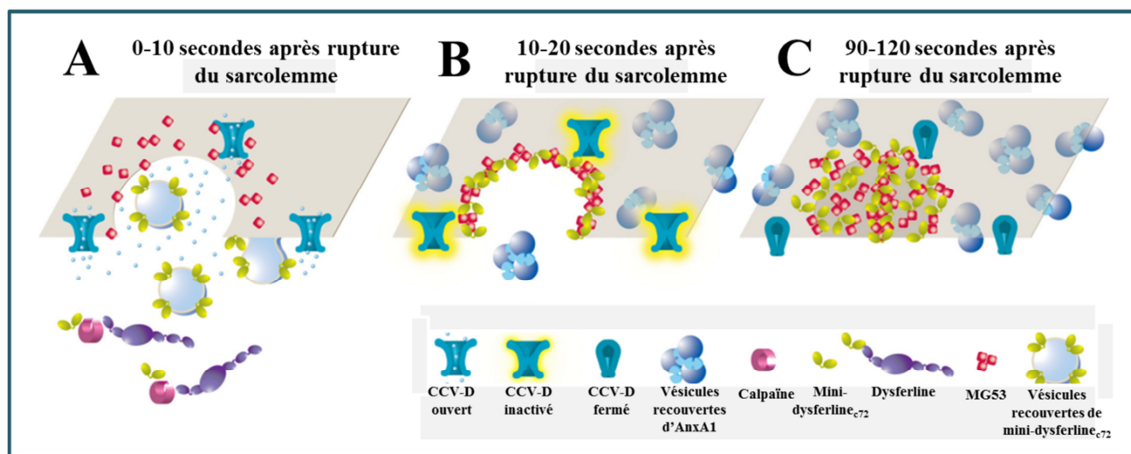


Figure 2.6 : Modèle de réparation du sarcolemme proposé. (A) Dans ce modèle, l'influx massif de Ca^{2+} entraîne un changement de potentiel membranaire au niveau du site de rupture et une cascade d'événements intracellulaires, dont le clivage d'un pool de dysferline en mini-dysferline₇₂ par les calpaïnes. Il entraîne également l'ouverture de canaux calciques voltages dépendants (CCV-D), la formation de vésicules recouvertes de mini-dysferline₇₂ et le recrutement de la protéine MG53 au site de rupture. (B) L'inactivation des CCV-D s'accompagne du recrutement et de la fusion au site de rupture des vésicules recouvertes d'AnxA1. La région membranaire endommagée est bordée de MG53 et de mini-dysferline₇₂. (C) Le colmatage de la rupture est finalisé par la fusion des vésicules recouvertes par l'AnxA1 et la fermeture des CCV-D. Figure adaptée de (Lek et al. 2013).

Cet ensemble d'événements est suivi, dans les 20 secondes suivant la rupture du sarcolemme, par l'inactivation des CCV-D et le recrutement et la fusion au niveau du site de rupture de vésicules recouvertes de mini-dysferline₇₂, mais aussi d'AnxA1 (**Figure 2.6B**). MG53 est alors retrouvée en bordure de la zone lésée. Le processus de fermeture de la rupture est finalisé par la fusion des vésicules recouvertes par l'AnxA1 et la fermeture des CCV-D dans les 90 à 120 secondes après la rupture.

Le recrutement spécifique de l'AnxA1 au niveau du site de rupture, pour des lésions membranaires induites par irradiation laser, a aussi été observé pour des cellules humaines de la lignée Hela (A. K. McNeil et al. 2006). Les cellules Hela, exprimant une AnxA1 mutante insensible au Ca^{2+} , sont incapables de réparer des ruptures de leur membrane plasmique, après irradiation laser. L'ensemble de ces résultats montrent que l'AnxA1 joue un rôle important dans la réparation membranaire de différents types cellulaires, par recrutement Ca^{2+} -dépendant au niveau des sites de rupture.

L'AnxA1 a aussi été identifiée comme un composant de la machinerie de réparation membranaire pour des cellules endommagées par des PFTs (E. B. Babiychuk et al. 2009). Il a été observé que les cellules HEK293, exposées à des PFTs, développent des bourgeonnements membranaires, suivis de la libération dans le milieu extracellulaire de microparticules contenant de l'AnxA1. En effet, la perméabilisation de ces cellules entraîne un recrutement de l'AnxA1 au niveau de petites régions à haute concentration en Ca^{2+} , correspondant probablement aux pores membranaires. La diminution de l'expression de l'AnxA1, par une stratégie d'ARNi, diminue fortement la capacité des cellules exposées aux PFTs à survivre

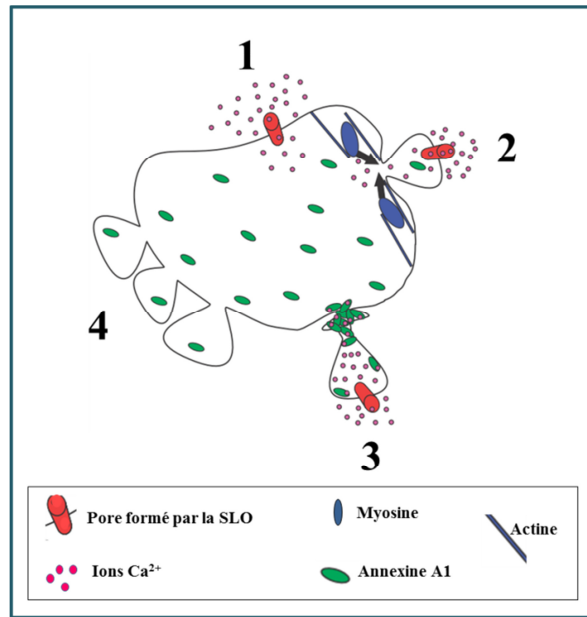


Figure 2.7 : Représentation schématique du mode d'intervention de l'Annexine-A1 dans la réparation membranaire pour des cellules exposées à des PFTs. (1) La perméabilisation des cellules après formation de pores par la SLO entraîne un influx de Ca^{2+} extracellulaire. (2) L'augmentation de la concentration locale en Ca^{2+} provoque l'activation des myosines non musculaires corticales, qui initient la contraction de la membrane plasmique par interaction avec les filaments d'actine corticale. Cette activité contractile génère la formation d'un bourgeon membranaire. La fermeture spontanée du bourgeon permet son émission sous forme de microparticules contenant les toxines. (3) Si l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire est trop importante ($10\mu\text{M}$) l'AnxA1 est recrutée au niveau

des régions perméabilisées de la membrane plasmique et bloque la communication entre le corps cellulaire et le bourgeon. (4) La formation de bourgeon en absence de toxines observée pour des cellules stressées serait un mécanisme préventif de défense contre une attaque imminente. Figure adaptée de (Draeger, Monastyrskaya, et Babiychuk 2011).

(E B Babiychuk et al. 2011). Dans le modèle proposé à la suite de ces études, la perméabilisation des cellules par les PFTs provoque un influx de Ca^{2+} (**Figure 2.7, 1**). Cet influx de Ca^{2+} active les myosines non musculaires à proximité des zones perméabilisées et induit la contraction du cytosquelette d'actine corticale. Cette contraction permet d'initier le bourgeonnement de la région membranaire perméabilisée (**Figure 2.7, 2**). La contraction peut aboutir à une scission totale du bourgeon et sa libération sous forme de microparticule. Lorsque la concentration calcique libre intracellulaire dépasse le seuil de $10\mu\text{M}$, l'AnxA1 est recrutée au niveau des régions membranaires perméabilisées et permet la compartimentalisation totale du bourgeon et sa libération dans le milieu extracellulaire, sous forme de microparticule (**Figure 2.7, 3**). Il a aussi été observé une formation de bourgeons de la membrane plasmique, en absence de PFTs pour des cellules en condition de stress. La formation de ces bourgeons serait un mécanisme préventif, afin de préparer les cellules à un dommage imminent (**Figure 2.7, 4**).

C2. Annexine-A2 et réparation membranaire

Comme il a été abordé dans le chapitre précédent, l'AnxA2 est impliquée dans la réparation membranaire de cellules musculaires murines, en partenariat avec l'AnxA1 et la Dysferline, selon un mécanisme encore mal compris (Lennon et al. 2003).

Une étude très récente a mis en évidence son implication dans la réparation membranaire pour une lignée tumorale de cancer du sein MCF7 (Jaiswal et al. 2014). Pour cette étude, la lignée tumorale a été rendue métastatique, par surexpression d'une forme tronquée de l'oncogène ErbB2 (p95ErbB2). L'AnxA2 et la protéine S100A11 sont fortement exprimées dans de

nombreuses tumeurs et ont été associées au processus métastatiques pour des tumeurs pancréatiques, pulmonaires et du colon (« Plasma membrane repair provides a new strategy for targeting metastatic cancer cells » 2015). La rupture membranaire de ces cellules, par irradiation laser, est suivie du recrutement d'AnxA1 indépendamment de la protéine S100A11. En revanche, le recrutement de la protéine S100A11 est dépendant de la présence de l'AnxA2 au site de rupture. Dans ce modèle (**cf Figure 1.41**), les auteurs ont suggéré que la rupture de la membrane plasmique (**Figure 1.41, 2**) entraîne une élévation importante de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, qui aboutit à la dépolymérisation locale du cytosquelette cortical ainsi qu'à l'activation des AnxA1 et A2. La dépolymérisation du cytosquelette entraîne une diminution importante de la tension membranaire à l'endroit de la rupture. L'AnxA2, activée et complexée à la protéine S100A11 sous forme hétérotétramérique, se lie aux filaments d'actine en dépolymérisation et les stabilise. Le complexe permet également le recrutement d'un nouveau pool de filaments d'actine au niveau du site de rupture (**Figure 1.41, 3**). Le recrutement d'actine ainsi que l'accumulation de vésicules membranaires permettrait d'exciser la partie endommagée de la membrane par un mécanisme lié à l'activité du complexe actomyosine (**Figure 1.41, 4**). L'étude des Anx dans les cellules métastatiques présente un intérêt certain. En effet, les cellules métastatiques sont des cellules très actives et mobiles, susceptibles d'être exposées à des contraintes mécaniques, par frottement, aboutissant à des ruptures fréquentes de leur membrane plasmique. Il est très probable que leur survie dépende de la présence d'une machinerie de réparation membranaire très performante.

C3. Annexine-A5 et réparation membranaire

L'équipe a montré que l'AnxA5 joue un rôle essentiel dans la réparation membranaire des cellules périvasculaires murines (Bouter et al. 2011). La déficience en AnxA5 dans ces cellules est associée à leur incapacité de réparer leur membrane suite à un dommage mécanique par irradiation laser. L'équipe a montré que l'ajout d'AnxA5 recombinante, dans le milieu extracellulaire, restaure la capacité de réparation des cellules déficientes et promeut la réparation membranaire chez les cellules sauvages. L'ajout d'une AnxA5 mutante pouvant se lier aux membranes, mais incapable de réseau-2D, ne permet ni de restaurer la capacité de réparation pour les cellules déficientes, ni de promouvoir la réparation pour des cellules sauvages. Il a enfin été montré que l'AnxA5, endogène ou extracellulaire, se lie au site de rupture quelques secondes après le dommage. L'équipe a proposé que la rupture de la membrane plasmique est suivie d'une entrée massive de Ca^{2+} dans le cytoplasme. La rupture micrométrique initie une tension locale très forte, due aux forces exercées par le cytosquelette cortical, favorisant la déchirure membranaire (**Figure 2.8B**). Le mélange local des milieux intracellulaire et extracellulaire crée un microenvironnement riche en Ca^{2+} et en PS, localisées sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Cette combinaison est propice à la liaison de l'AnxA5 aux bords de la zone membranaire endommagée (**Figure 2.8C**). La liaison de l'AnxA5 au feuillet interne de la membrane plasmique est suivie de son auto-assemblage en réseau-2D autour de la rupture

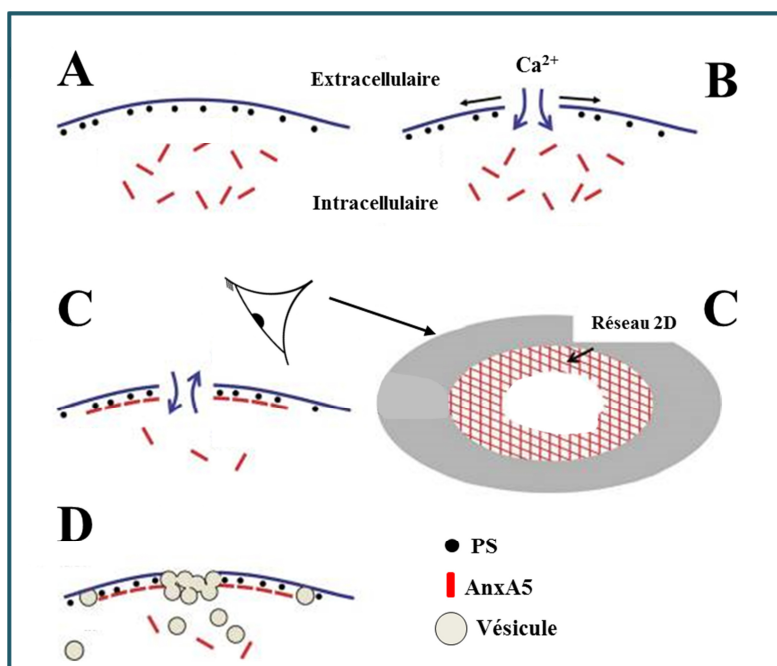


Figure 2.8 : Réparation membranaire et Annexine-A5. (A) La membrane plasmique intacte est responsable du maintien d'une concentration en Ca^{2+} cytosolique de l'ordre de 100nM. Dans le milieu extracellulaire le Ca^{2+} est à une concentration de l'ordre du mM. (B) La rupture de la membrane plasmique provoque une entrée massive de Ca^{2+} dans le compartiment intracellulaire et génère une tension membranaire par le cytosquelette cortical, favorisant sa déchirure. (C) Le mélange local des milieux intracellulaire et extracellulaire crée un microenvironnement riche en Ca^{2+} et en PS, qui favorise la liaison de l'AnxA5 sur le feuillet interne de la membrane plasmique, au niveau de la zone de rupture. La liaison de l'AnxA5 est suivie de son auto-assemblage en trimères, puis en réseau-2D, autour de la rupture. (D) Ce réseau-2D s'oppose aux forces de tension exercées par le cytosquelette et favorise la réparation de la membrane plasmique. Adapté de (Bouter et al. 2011).

(Figure 2.8C, vue du dessus). Ce réseau-2D s'oppose aux forces de tension du cytosquelette, empêche la déchirure et favorise la réparation de la membrane plasmique.

C4. Annexine-A6 et réparation membranaire

L'AnxA6 a été identifiée comme un composant de la machinerie de réparation pour des ruptures mécaniques de la membrane plasmique et pour la perméabilisation de cellules par des PFTs.

Dans le cas de ruptures mécaniques, il a été montré *in vivo*, pour des embryons du poisson zèbre, qu'un dommage du sarcolemme conduit au recrutement de l'AnxA6 au site de rupture, indépendamment de la présence de dysferline (Roostalu et Strähle 2012). Le recrutement d'AnxA6 s'opère dans les 20 secondes suivant la rupture du sarcolemme. Ce recrutement est suivi d'un recrutement de l'isoforme a de l'AnxA11, puis des isoformes a de l'AnxA2 et de l'AnxA1. Chez ces embryons, l'inhibition de l'expression de l'AnxA6 provoque le développement d'une forme de myopathie, similaire à celle observée en cas de déficience en dysferline. La double inhibition de l'expression de la dysferline et de l'AnxA6 génère le développement d'une forme de myopathie sévère, avec atteinte cardiaque et désorganisation

Introduction

des structures myofibrillaires du muscle strié squelettique. Pour tous ces modèles de myopathies, les auteurs ont observé une accumulation lente d'AnxA1a et d'AnxA2a au sarcolemme des cellules musculaires striées squelettiques. La rupture du sarcolemme entraînerait donc le recrutement de dysferline et d'AnxA6, de manière indépendante. L'AnxA6 et la dysferline, une fois présentes au site de rupture, fonctionneraient par coopération pour faciliter l'accumulation des AnxA1 et A2, et des vésicules intracellulaires. La réparation du sarcolemme serait ainsi basée sur la formation d'un échafaudage moléculaire de différentes Anx, coopérant pour faciliter la réparation membranaire. Le détail mécanistique de la participation de chacune des Anx reste à approfondir.

Dans des cellules HEK293 exposées à des PFTs, il a été montré que l'inhibition de l'expression de l'AnxA6, par une approche d'ARNi, réduit considérablement la proportion des cellules survivant à l'exposition de PFTs (Potez et al. 2011). L'exposition des cellules à la SLO provoque un recrutement rapide de l'AnxA6, suivi de la formation de bourgeons membranaires et l'émission de microparticules. Les microparticules émises contiennent à la fois des PFTs et de l'AnxA6. L'AnxA6 possède une sensibilité au Ca^{2+} plus importante que l'AnxA1. Dans des cellules faiblement perméabilisées, seule l'AnxA6 est recrutée ce qui suggère que son intervention suffit à la survie des cellules (**Figure 2.9A, circuit 1-2-2a-1**). Une proportion significative de l'AnxA6 est alors éliminée par émission des microparticules, contenant les pores nucléaires. Lorsque la cellule est immédiatement réexposée à la SLO ou exposée à une quantité plus importante, la diminution de la quantité d'AnxA6 intracellulaire ne permet pas une réparation rapide, entraînant une élévation de la concentration en Ca^{2+} au-delà du seuil des $10\mu\text{M}$ (**Figure 2.9A, circuit 1-2-3-3a-1**). Cette élévation de la concentration en Ca^{2+} provoque le recrutement de l'AnxA1, qui compense l'absence d'AnxA6.

L'existence de protrusions membranaires influence également le processus de réparation membranaire. Les observations montrent que les protrusions sont plus riches en AnxA1. Si les pores de SLO sont formés dans le corps cellulaire (**Figure 2.9B, circuit 1-2-2a-1**) l'AnxA6 est recrutée en priorité pour faciliter l'élimination du pore. Cependant lorsqu'un pore se forme sur une protrusion, l'absence ou la faible densité d'organelles, ainsi que le faible volume de cytosol favorise l'apparition d'un gradient de concentration calcique important rapidement. L'AnxA1 concentrée dans cette partie de la cellule est alors recrutée au niveau des sites membranaires perméabilisés pour l'élimination des toxines (**Figure 2.9B, circuit 1-2-3-4-5-1**).

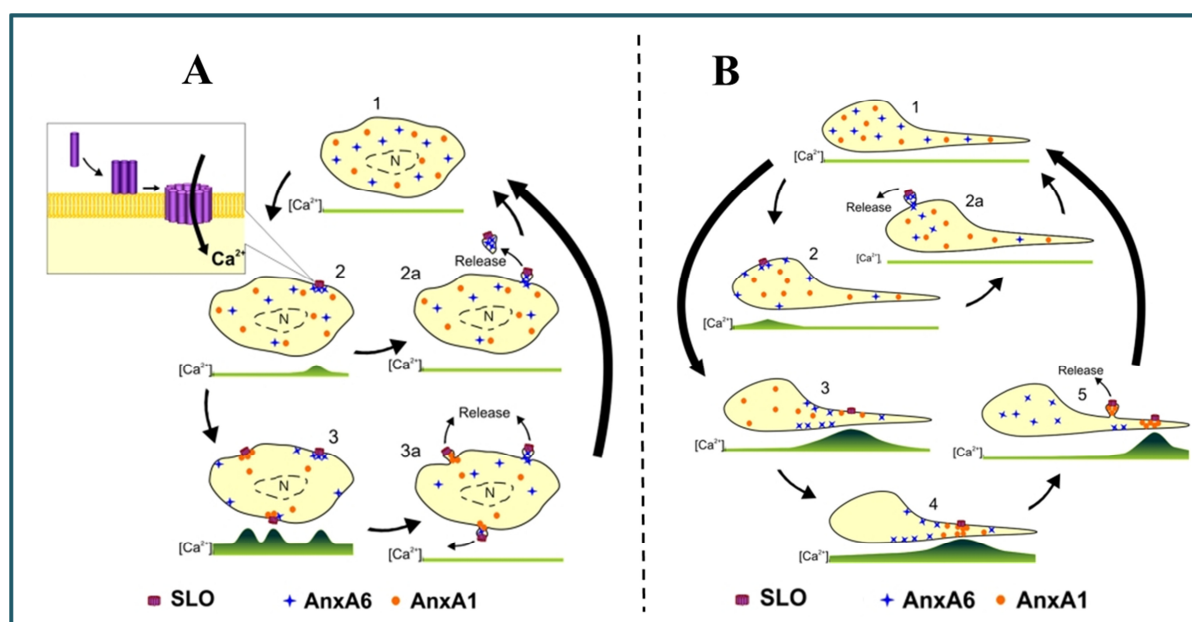


Figure 2.9 : Représentation schématique de la coopération entre l'AnnexineA6 et l'AnnexineA1 pour la réparation membranaire des cellules exposées à PFTs. (A) L'exposition des cellules à une faible quantité de SLO, (**circuit 1-2-2a-1**) provoque le recrutement d'AnxA6 et l'émission de microparticules dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme diminue la quantité d'AnxA6 intracellulaire. Lorsque la cellule est immédiatement réexposée à la SLO ou exposée à une quantité importante de SLO (**circuit 1-2-3-3a-1**), la déficience en AnxA6 empêche une réparation rapide, entraînant une élévation de la concentration en Ca^{2+} libre, au-delà du seuil des $10\mu M$. Cette élévation de la concentration en Ca^{2+} provoque le recrutement de l'AnxA1, qui compense l'absence d'AnxA6. (B) Dans le cas de cellules présentant des protrusions, si les pores de SLO sont formés dans le corps cellulaire (**circuit 1-2-2a-1**), l'AnxA6, plus sensible, est recrutée pour faciliter l'élimination du pore. Cependant lorsqu'un pore se forme sur une protrusion, l'absence ou la faible densité d'organelles, ainsi que le faible volume de cytosol favorisent l'apparition d'un gradient de concentration calcique important rapidement. L'AnxA1, sur-représentée dans cette partie de la cellule, est recrutée au niveau des sites membranaires perméabilisés (**circuit 1-2-3-4-5-1**). Figure adaptée de (Potez et al. 2011).

Récemment la mutation du gène codant l'AnxA6 a été proposée comme étant un facteur aggravant des formes de dystrophie musculaire des ceintures de type 2C (Swaggart et al. 2014). Ces formes de dystrophie ont toutes en commun des mutations d'un composant du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine, appelé sarcoglycane- γ . Différentes manifestations cliniques existent pour cette forme de dystrophie musculaire, dont des formes sévères avec atteinte cardiaque. Une séquence mutée sur un site d'épissage de la séquence codant l'AnxA6 a été identifiée comme associée au développement de formes sévères chez la souris. Cette séquence mutée code pour une forme tronquée de l'AnxA6, composée uniquement de 3 domaines Anx de la partie C-Terminale. Cette forme tronquée présente une masse moléculaire de 32kDa. La co-expression de ce mutant d'AnxA6 semble interférer avec le recrutement de l'AnxA6 sauvage dans les fibres musculaires murines et perturbe la réparation membranaire. L'étude de cette forme tronquée pourrait donner des informations précieuses sur la façon dont agit l'AnxA6 dans la réparation de ruptures mécaniques.

Chapitre n°3 : Le tissu musculaire strié squelettique

Les mouvements cellulaires sont possibles par des mécanismes de contraction résultant de l'interaction entre des protéines motrices, comme les myosines, et les filaments du cytosquelette d'actine (Mitchison et Cramer 1996), (Lodish et al. 2000). Les cellules musculaires matures sont des cellules qui sont spécialisées dans le phénomène de contraction, fonctionnant sous forme d'unités contractiles uni- ou pluricellulaires. Le tissu musculaire est le tissu majoritaire chez un humain adulte en bonne santé. Il représente entre 30 et 40% de sa masse corporelle (Janssen et al. 2000).

Le tissu musculaire est composé de trois types de tissu assurant des fonctions distinctes :

-le tissu musculaire lisse est un tissu disséminé dans l'organisme, principalement au niveau de cavités creuses, comme le tube digestif, ou autour des vaisseaux et capillaires sanguins. Son activité est régulée par le système nerveux autonome ainsi que des stimuli hormonaux et cytokiniques. Il n'est donc pas contrôlé volontairement. Les unités motrices de ce tissu sont des cellules mononucléées fusiformes appelées léiomyocytes. Elles exercent leurs fonctions sous plusieurs formes. Elles peuvent agir sous forme de cellules isolées, sous forme de cellules groupées par des jonctions en couches superposées en tuniques (cas des organes creux) et, plus rarement, en petits muscles individualisés (exemple des muscles arrecteurs des poils, constricteurs et dilatateurs de l'iris, etc). Le tissu musculaire lisse a pour fonctions principales la circulation des substances et fluides dans le corps, le maintien des structures tissulaires et l'élasticité de nombreux organes.

-le tissu musculaire strié cardiaque est uniquement présent au niveau du cœur, sous la forme d'une structure appelée myocarde. Le tissu musculaire strié cardiaque est composé de cellules mononucléées, cylindriques, appelées cardiomyocytes. Les cardiomyocytes sont connectés par leurs extrémités, pour former un réseau tridimensionnel complexe. Le rythme des battements cardiaques est déterminé par l'activité intrinsèque des cardiomyocytes. Les cardiomyocytes sont spontanément excitables, leur dépolarisation et repolarisation rythmique est indépendante du système nerveux. Toutefois le système nerveux autonome exerce une influence sur le rythme des contractions : le système nerveux parasympathique diminue la fréquence des cycles contraction/relaxation alors que le système nerveux orthosympathique l'augmente.

-le tissu musculaire strié squelettique est le tissu musculaire à contraction volontaire. Il est contrôlé par le système nerveux cérébrospinal et l'envie de se lever de son lit pour partir faire quelques expériences scientifiques au laboratoire. Les cellules à activité contractile de ce tissu sont appelées rhabdomyocytes ou fibres musculaires. Ce sont de grandes cellules cylindriques, allongées et plurinucléées, très riches en protéines du cytosquelette. Le tissu musculaire assure plusieurs fonctions : le maintien de la posture (motricité statique), la production de mouvements volontaires (motricité dynamique), la thermorégulation corporelle par le dégagement de chaleur liée à l'activité contractile, et la participation à la régulation de

la balance énergétique. Son activité au repos correspond à 20% des dépenses énergétiques du métabolisme basal (Gallagher et al. 1998). Au-delà de considérations purement (patho)physiologiques, le tissu musculaire strié squelettique joue également un rôle social essentiel. Il permet l'indépendance de la personne, la communication verbale et non verbale et un ensemble d'actions nécessaires aux interactions sociales.

Ce tissu est le premier pour lequel il a été montré que certaines atteintes pathologiques dégénératives, regroupées sous le terme de dysferlinopathies, sont la conséquence d'une défaillance du processus de réparation membranaire. De nombreuses études sur la réparation membranaire, dont la nôtre, se sont logiquement orientées vers ce tissu.

A. Anatomie et organisation subcellulaire du muscle strié squelettique

A1. Organisation générale des muscles striés squelettiques

Le corps humain est composé d'environ 640 muscles. Un nombre plus précis ne peut être donné puisqu'il existe une variabilité entre individus (« Traité des Variations de Système Musculaire de l'Homme, et leur Signification au Point de Vue de l'Anthropologie Zoologique » 1898). Tous ces muscles assurent leurs fonctions via des propriétés fondamentales qui les caractérisent :

- l'excitabilité, qui est la faculté de percevoir un signal et d'y répondre.
- la contractilité, qui est la capacité de se contracter de manière appropriée à la stimulation.
- l'élasticité, qui est la capacité des fibres musculaires de s'étirer et puis de revenir à leur état initial. Cette propriété est très importante car elle confère aux fibres une tolérance aux variations mécaniques brutales durant la contraction.
- l'extensibilité, qui est la faculté d'étirement. Les fibres musculaires peuvent être étirées au-delà de leur longueur de repos. Elle confère également aux fibres musculaires une tolérance aux contraintes mécaniques liées à la contraction.
- la plasticité, qui est la faculté du muscle à modifier sa structure, selon le travail qu'il effectue à long terme. Un entraînement physique excessif conduit à une hypertrophie, alors qu'une immobilisation complète conduit à l'atrophie.

Le tissu musculaire strié squelettique est composé d'un ensemble de populations cellulaires et en particulier des fibres musculaires. Un muscle strié squelettique est délimité par une enveloppe de tissu conjonctif fibreux, appelée épimysium (**Figure 3.1**). Cette enveloppe assure le maintien et la protection du muscle lors de la contraction. Elle est aussi impliquée dans le lien qui unit le muscle à l'ossature, puisque ses extrémités forment les tendons, qui assurent l'ancrage du muscle au squelette osseux. Un muscle est subdivisé en un ensemble de faisceaux musculaires. Chaque faisceau est composé de plusieurs dizaines de fibres musculaires dont l'ensemble est entouré d'une gaine conjonctive, appelée périmysium. Le périmysium permet de structurer le muscle et participe aussi à l'ancrage du muscle à l'ossature. Au sein d'un faisceau musculaire, chaque fibre musculaire est entourée d'une gaine de matrice extracellulaire appelée lame basale ou endomysium. Cette matrice

Introduction

extracellulaire, essentiellement composée de collagène, assure la stabilité de la fibre musculaire par liaison à son cytosquelette. Elle assure également la cohésion des faisceaux musculaires en établissant des connexions entre les fibres musculaires voisines. En plus des fibres musculaires et du tissu conjonctif, un muscle est parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Chaque fibre musculaire est en contact avec une fibre nerveuse pour former une plaque motrice. Une fibre nerveuse peut en revanche être en contact avec plusieurs fibres. Les vaisseaux sanguins traversent l'épimysium et se ramifient en un réseau dense de capillaires, qui passe à travers le périmysium puis l'endomysium pour entrer en contact avec chaque fibre musculaire.

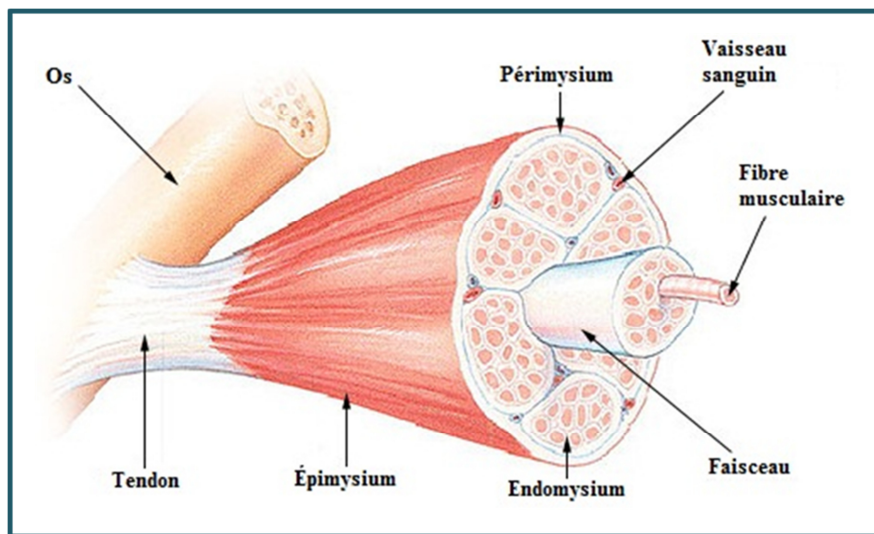


Figure 3.1 : Représentation schématique de l'organisation générale d'un muscle strié squelettique. Un muscle strié squelettique est attaché à un os par l'intermédiaire de tendons, qui sont constitués essentiellement de tissu fibreux, élastique et solide. L'épimysium est le tissu conjonctif fibreux qui enveloppe l'ensemble du muscle. Le muscle est subdivisé en faisceaux musculaires, délimités par une membrane conjonctive, appelée périmysium. Chaque faisceau est un ensemble de 10 à 100 fibres musculaires, elles-mêmes entourées d'une couche de tissu conjonctif, appelée endomysium. Un muscle est également parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Figure tirée du site alloprof.qc.ca/science-et-technologie/.

Le muscle est composé de cellules souches mononucléées, appelées cellules satellites (**Figure 3.2**). Ces cellules sont situées entre l'endomysium et les fibres musculaires. Les cellules satellites sont généralement quiescentes. En cas de lésion musculaire, elles sont capables de proliférer, de se différencier et de fusionner pour former des nouvelles fibres musculaires. Elles peuvent aussi fournir le matériel membranaire permettant la survie de fibres endommagées. Ces cellules sont considérées comme le principal contributeur à la croissance et la maintenance musculaires postnatales (Y. X. Wang et Rudnicki 2012). Plusieurs muscles peuvent être regroupés, emballés sous une couche tissulaire, nommée aponévrose, formant ainsi une loge musculaire. Les aponévroses sont inextensibles, elles soutiennent les cellules musculaires et imposent une orientation pour la contraction.

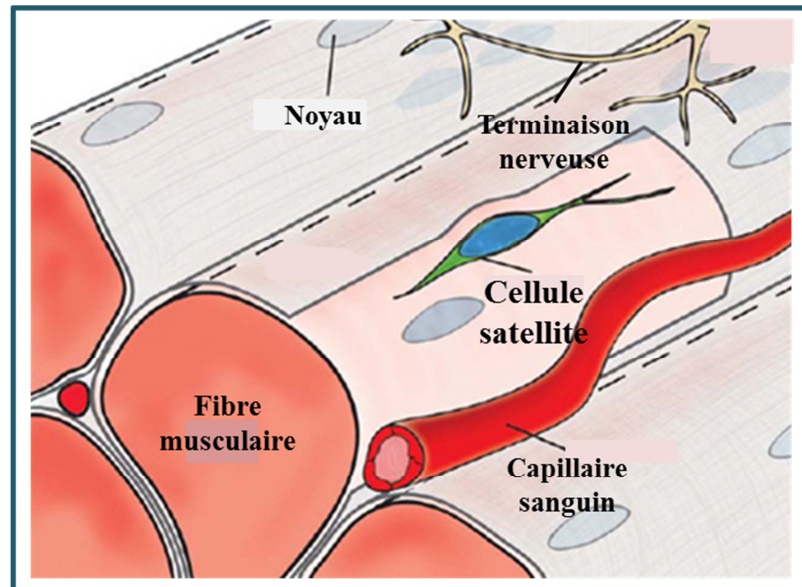


Figure 3.2 : Représentation schématique de la structure générale interne d'un muscle avec localisation d'une cellule satellite. Les cellules satellites sont des cellules progénitrices mononucléées présentes entre la lame basale (endomysium) et la membrane plasmique des fibres musculaires. Généralement quiescentes elles peuvent être activées pour permettre la croissance, la régénération ou la réparation post-natales du muscle. Figure adaptée du site <http://www.museum.toulouse.fr>

A2. Organisation des fibres musculaires

La **Figure 3.3** illustre l'organisation générale du muscle ainsi que l'organisation moléculaire des myofibrilles. Les fibres musculaires ont une forme tubulaire et allongée. Elles peuvent mesurer de quelques centaines de μm à plusieurs dizaines de centimètres de long pour un diamètre compris entre 10 et $100\mu\text{m}$. Les fibres musculaires sont délimitées par le sarcolemme (membrane plasmique) et l'endomysium. Le sarcolemme délimite le sarcoplasme (cytoplasme), un grand nombre de noyaux situés en périphérie de la cellule, des mitochondries, le réticulum sarcoplasmique (réticulum endoplasmique) ainsi qu'un ensemble d'autres organites. Le réticulum sarcoplasmique forme un réseau vaste de canalicules. Il est la réserve principale de Ca^{2+} des fibres musculaires. L'appareil contractile d'une fibre musculaire est appelé myofibrille. Une fibre musculaire contient plusieurs myofibrilles délimitées par les tubules longitudinaux du réticulum sarcoplasmique. Les myofibrilles occupent environ 80% du volume des fibres musculaires. Elles sont composées d'un ensemble de protéines aux capacités motrices, sensibles et structurales. C'est l'agencement longitudinal, par superposition de filaments d'actine et de filaments de myosine, qui permet le mécanisme de contraction. L'organisation des protéines, composant une myofibrille, forme des structures répétées qui apparaissent sous forme d'une succession de bandes claires et bandes sombres, en microscopie optique à lumière polarisée. C'est cette alternance de bandes (stries) qui est à l'origine du terme « tissu musculaire strié ».

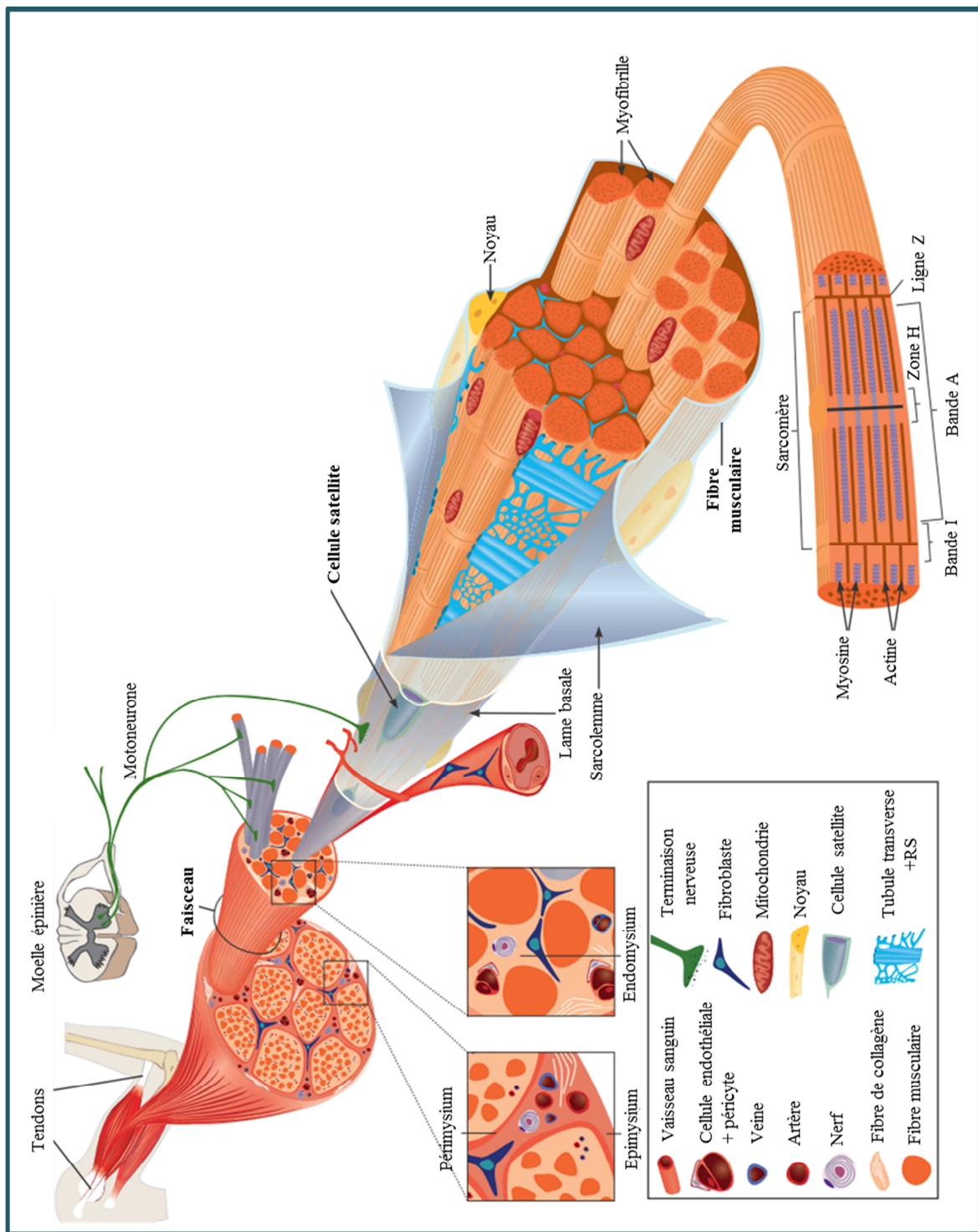


Figure 3.3 : Représentation schématique de l'organisation générale d'un muscle strié squelettique de l'échelle tissulaire à l'échelle moléculaire. Figure adaptée de (Tajbakhsh 2009)

Introduction

- **les bandes A** (ou Anisotropes) correspondent aux bandes sombres. Elles sont riches en filaments épais de myosine (de 10nm à 16nm de diamètre) et sont séparées en leur centre par une région plus claire appelée zone H.

- **les bandes I** (ou Isotropes) correspondent aux bandes claires. Elles sont riches en filaments fins d'actine. Au centre des bandes I une zone plus foncée correspond à la ligne Z.

L'unité structurale moléculaire de la contraction est appelé sarcomère (**Figure 3.4**). C'est la plus petite unité contractile des fibres musculaires. Un sarcomère est un assemblage moléculaire dense très organisé. Outre les filaments d'actine et de myosine, un sarcomère est composé de protéines directement impliquées dans le mécanisme de contraction, telles que la troponine ou la tropomyosine, de protéines de structure et de protéines d'entretien, comme la calpaïne-3. Les protéines de structure sont enrichies au niveau des lignes Z et au niveau des lignes M ce qui explique l'aspect sombre de ces structures en microscopie électronique.

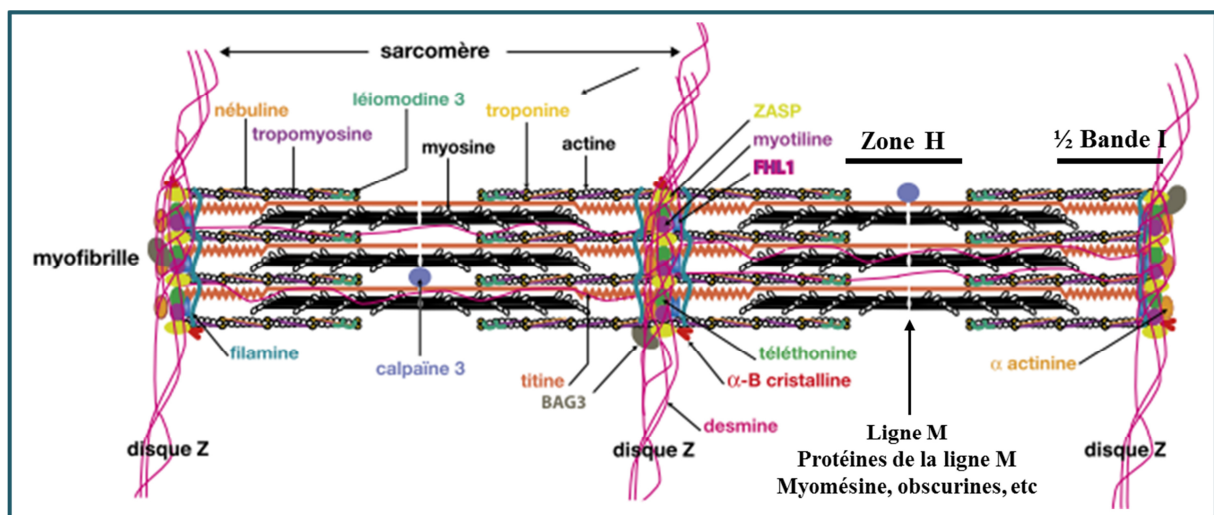


Figure 3.4 : Organisation moléculaire d'un sarcomère. Le sarcomère est composé d'un agencement longitudinal de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine, ainsi que des protéines liées directement au mécanisme de contraction (troponine, tropomyosine, etc). Il contient également des protéines de structure qui permettent le maintien et la disposition spatiale correcte des protéines contractiles. Ces protéines forment notamment les disques Z. Non schématisées dans la figure, les protéines de la ligne M permettent l'assemblage et le maintien des filaments épais de myosine. Un sarcomère contient aussi des protéines d'entretien comme la calpaïne-3. Figure tirée du site <http://www.myobase.org>.

La contraction des fibres musculaires correspond au raccourcissement des sarcomères. Ce sont les bandes I qui diminuent de taille alors que la longueur des bandes A reste inchangée. La contraction musculaire est initiée par la stimulation des fibres musculaires par un motoneurone et elle est dépendante de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. Le couplage excitation contraction se fait par la présence de structures membranaires particulières du sarcolemme. Le sarcolemme présente des invaginations régulières le long des fibres

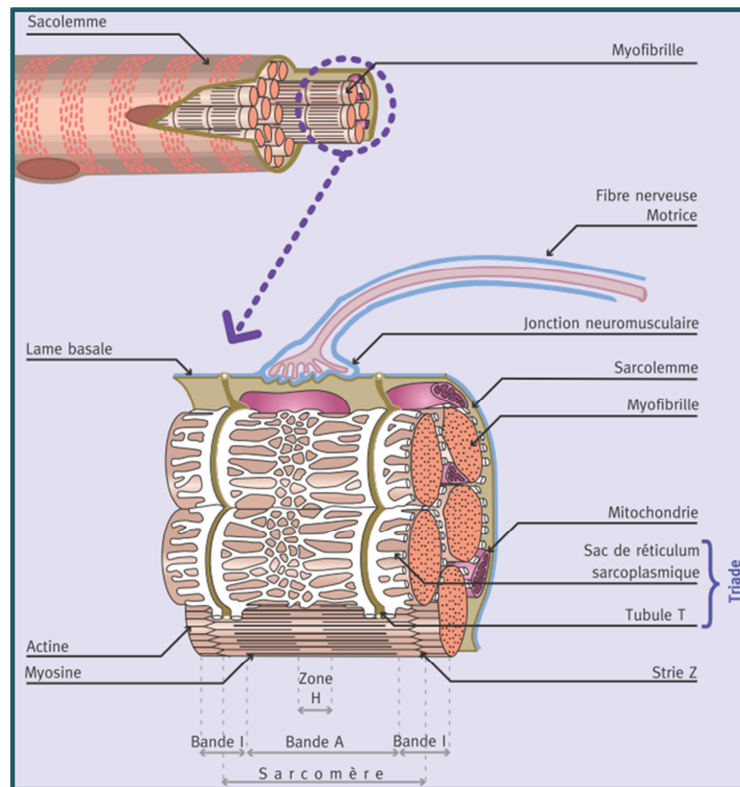


Figure 3.5 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction par la présence de tubules-T et du réticulum sarcoplasmique. Le sarcolemme s'invagine sur toute la surface des fibres musculaires, pour former des canaux transversaux aux myofibrilles, appelés tubule transverse (tubule-T). Les tubules-T permettent la conduite rapide du phénomène de dépolarisation du sarcolemme, suite à la stimulation par un motoneurone au niveau de la jonction neuromusculaire. Cette disposition du sarcolemme permet l'excitation presque simultanée de toutes les parties de la fibre musculaire à partir d'une unique plaque motrice. Les réseaux de tubules-T sont localisés de part et d'autre des disques Z des sarcomères.

musculaires (**Figure 3.5**). Ces structures en canaux, disposées perpendiculairement aux myofibrilles, sont appelées tubule transverse (tubule-T). Elles permettent la conduite rapide du phénomène de dépolarisation du sarcolemme, suite à la stimulation par un motoneurone, au niveau de la jonction neuromusculaire (**Figure 3.5**). La présence des tubules-T permet une dépolarisation en profondeur de la fibre musculaire.

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est l'organelle principale pour la régulation de l'homéostasie calcique, et par conséquent, du contrôle du cycle raccourcissement-relaxation des sarcomères. Il assure le stockage, la libération et la récupération du Ca^{2+} lors de la contraction musculaire. Le RS est organisé en un réseau tridimensionnel qui enveloppe chaque myofibrille (**Figure 3.3** et **Figure 3.5**). Ce réseau est constitué de deux parties associées : le réticulum sarcoplasmique longitudinal et les citernes terminales. Le RS longitudinal est un réseau fin de tubules membranaires reliant les citernes terminales. Il est présent sur les bandes A et I des sarcomères (**Figure 3.5**). Ce réseau permet la recapture des ions Ca^{2+} dans le sarcoplasme. Les citernes terminales entourent complètement chaque myofibrille au niveau des jonctions entre les bandes A et les bandes I. Les citernes terminales

et les tubules-T sont associés en structures appelées triades. Une triade est formée par l'association de deux citernes terminales du RS et d'un tubule-T (**Figure 3.5**). Un sarcomère étant composé d'une bande A et de deux demies bandes I (**Figure 3.4**), chaque sarcomère est associé à deux triades (**Figure 3.5**). Le rôle des triades est de transformer l'onde de dépolarisation membranaire en un relargage de Ca^{2+} contenu dans les citernes terminales du RS, provoquant ainsi la contraction musculaire. La région membranaire du RS qui fait face au tubule-T est nommée réticulum sarcoplasmique de jonction (RSj). Au niveau du RSj, les tubules-T sont riches en récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) et la membrane du RS est riche en récepteurs à la ryanodine (Ryr), qui sont des canaux calciques.

Le DHPR est un canal calcique voltage dépendant de type L. Ryr est un canal formé par un hétérotétramère ayant une forte perméabilité au Ca^{2+} . Une région du complexe DHPR interagit directement avec le complexe Ryr1 (Ríos, Ma, et González 1991). C'est cette interaction physique qui permet le couplage entre la stimulation de la fibre musculaire et la contraction rapide et contrôlée.

B. La contraction musculaire

B1. Les myofilaments

Deux types de myofilaments permettent la contraction musculaire :

-Les myofilaments épais : les myofilaments épais sont composés majoritairement de myosine. La myosine (environ 500kDa) impliquée dans la contraction de fibres musculaires striées squelettiques est qualifiée de myosine de classe II ou myosine conventionnelle. C'est un polymère composé d'un enroulement de deux chaînes lourdes de myosines (MHC), d'environ 220 kDa chacune, associées à 2 chaînes légères dites régulatrices, de 20kDa chacune (MLC_{20}), et à 2 chaînes dites essentielles, de 17 kDa chacune (MLC_{17}) (**Figure 3.6A**).

Les chaînes régulatrices participent activement à la contraction, alors que les chaînes essentielles sont impliquées dans le maintien et la stabilité de l'ensemble. Un myofilament épais est un grand assemblage composé de 300 à 400 molécules de myosine (**Figure 3.6B**). Au sein d'une molécule de myosine les interactions non covalentes entre les différentes sous unités forment une molécule polaire asymétrique en forme de bâtonnet, avec une longueur d'environ 150nm pour une épaisseur de 2nm. Le domaine N-terminal des myosines forme une tête qui contient un domaine de liaison à l'actine et une activité ATPasique contrôlée par les ions Ca^{2+} (Clark et al. 2002).

-Les myofilaments fins : Les myofilaments fins sont composés de trois protéines: l'actine, la troponine et la tropomyosine (**Figure 3.7A**). L'actine est la protéine la plus abondante des protéines myofibrillaires, puisque elle représente 20 à 25% des protéines totales. La tropomyosine est une protéine dimérique composée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β qui entoure les filaments d'actine. Elle a un rôle de stabilisateur des filaments d'actine et masque les sites de liaison pour la myosine sur l'actine.

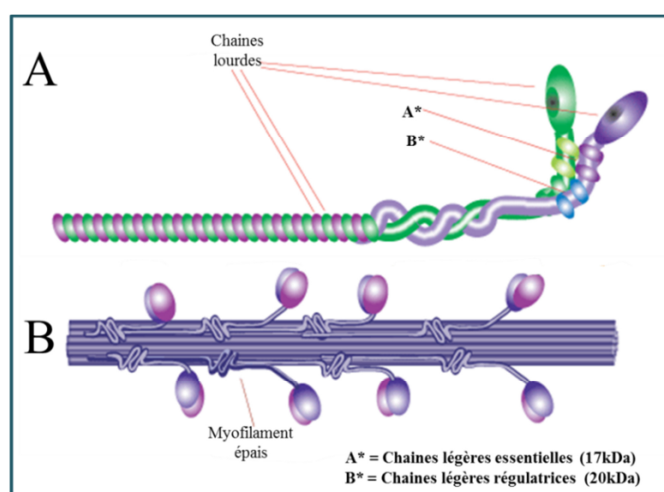


Figure 3.6 : Représentation schématique de la myosine dans les fibres musculaires striées squelettiques. (A) Les filaments de myosine sont des polymères composés de 2 chaînes lourdes de myosine, ayant chacune une masse moléculaire de 220kDa environ. Chaque chaîne lourde est associée à 2 chaînes légères, dites essentielles, ayant chacune une masse moléculaire de 17kDa et 2 chaînes légères, dites régulatrices, ayant chacune une masse moléculaire de 20kDa. Les chaînes régulatrices participent activement à la contraction alors que les chaînes essentielles participent au maintien de la stabilité de l'ensemble. (B) Les myofilaments épais sont composés de 300 à 400 molécules de myosine disposées en tête-bêche. Figure adaptée de www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/myosin.html

La troponine est une protéine globulaire constituée de trois sous-unités. La troponine I (TnI) est une sous-unité inhibitrice qui, en absence de Ca^{2+} , se lie à l'actine et masque les sites d'interaction actine-myosine. La troponine T (TnT) se lie à la tropomyosine et stabilise le complexe troponine-tropomyosine-actine. Enfin, la troponine C (TnC) est une sous-unité liant le Ca^{2+} . En absence de Ca^{2+} , les complexes troponine-tropomyosine exercent une inhibition constitutive de l'interaction actine-myosine par encombrement stérique. Lorsque du Ca^{2+} se lie à TnC, la troponine se déplace légèrement sur l'actine et entraîne avec elle la tropomyosine. Ce mouvement rend accessible les sites de liaisons à la myosine présents dans les filaments d'actine (**Figure 3.7b**).

B2. Schéma général de la contraction d'un muscle strié squelettique

Un muscle est composé d'un nombre important de fibres musculaires organisées en unités motrices. Une unité motrice représente l'ensemble des fibres innervées par un même motoneurone. La zone de contact d'un motoneurone est appelée jonction neuromusculaire. Cette jonction est composée d'une zone pré-synaptique, correspondant à la partie terminale du motoneurone, d'une fente synaptique, correspondant à l'espace entre la terminaison du motoneurone et le sarcolemme et d'une zone post-synaptique, correspondant au sarcolemme. La stimulation d'une fibre musculaire se fait au niveau des jonctions neuromusculaires (**Figure 3.8A**). L'acétylcholine libérée par le motoneurone dans la fente synaptique se lie sur des récepteurs nicotiniques au niveau du sarcolemme.

Introduction

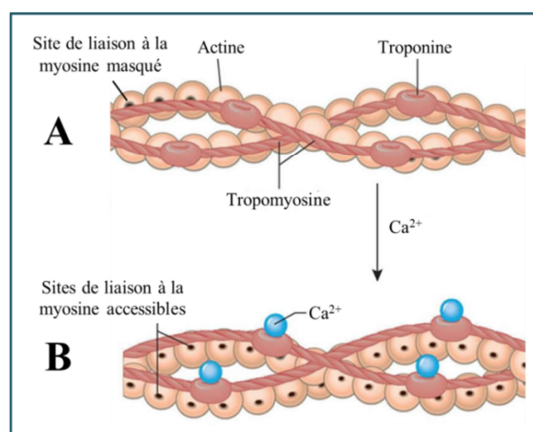


Figure 3.7 : Structure générale d'un myofilament fin. (A)

Un myofilament est composé par l'assemblage d'un myofilament d'actine (double hélice de monomères d'actine), de troponine et de tropomyosine. La tropomyosine est enroulée autour du filament d'actine, elle a un rôle de stabilisateur. La troponine est constituée de trois sous-unités. Une sous-unité se lie à la tropomyosine. Une sous-unité inhibitrice se lie à l'actine, en absence de Ca^{2+} . Enfin, une sous-unité lie le Ca^{2+} . **(B)** Lorsque le Ca^{2+} se lie à la troponine, celle-ci se déplace légèrement et entraîne avec elle la tropomyosine, rendant accessibles les sites de liaison à la myosine présents sur les monomères d'actine. Figure adaptée du site www.classes.midlandstech.edu

Les récepteurs nicotiniques s'ouvrent et laissent passer les ions Na^+ , provoquant une dépolarisation du sarcolemme. Cette dépolarisation génère un potentiel d'action qui se propage jusqu'aux tubules-T. Au niveau des tubules-T, le potentiel d'action active le DHPR, qui stimule RyR1. L'activation de RyR1 s'accompagne du relargage de Ca^{2+} par le RS dans le sarcoplasme. Le Ca^{2+} libéré se lie à la troponine, rendant accessible les sites de liaison pour la myosine sur les filaments d'actine.

La contraction est le résultat d'un raccourcissement des sarcomères. Le raccourcissement des sarcomères se fait par glissement des filaments d'actine sur les têtes de myosine (**Figure 3.8B**). La contraction est un phénomène très dynamique : un cycle de contraction dure environ 50ms dont 10ms durant lesquelles la myosine est liée à l'actine. La contraction a lieu tant que l'ATP est présent et que la concentration en Ca^{2+} dans le sarcoplasme est suffisante pour lever l'inhibition de la liaison entre l'actine et la myosine par la troponine.

C. Développement et régénération du muscle strié squelettique

C1. La myogénèse

La myogénèse du muscle strié squelettique est un processus complexe qui se caractérise par un enchainement d'événements cellulaires incluant des étapes de détermination, de prolifération et de différenciation. La myogénèse est un ensemble de mécanismes moléculaires et cellulaires coordonnés. Ces mécanismes varient en fonction des muscles en formation. Par exemple, la myogénèse des muscles des membres est la plus complexe du fait de l'éloignement entre le site où naissent les précurseurs myogéniques et la localisation finale des cellules musculaires matures.

La myogénèse se fait par l'expression différentielle de protéines appelées facteurs myogéniques. Chez les mammifères il existe quatre facteurs myogéniques (MRF pour « Myogenic Regulation Factor ») : Myf5, MyoD, Myog et Myf6. Ces protéines appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription à domaine bHLH (« basic-Helix-Loop-Helix »).

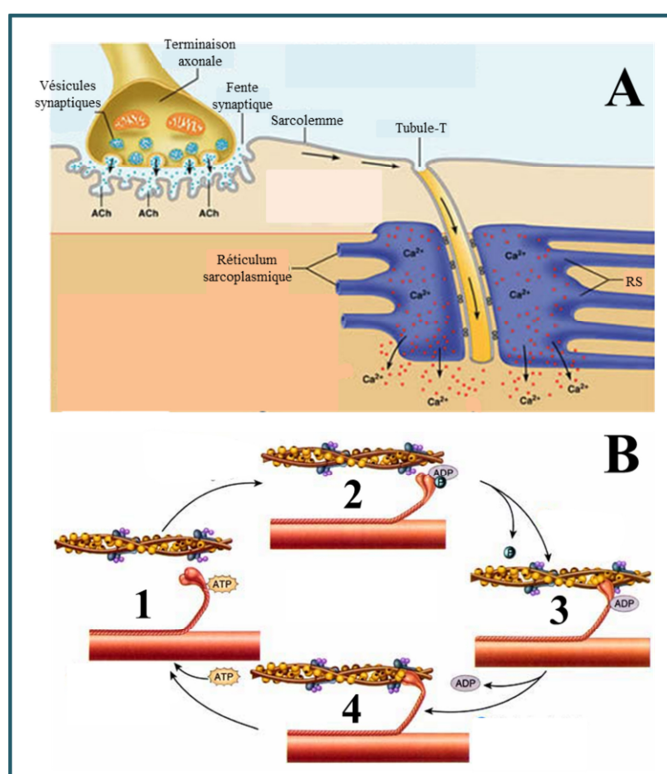


Figure 3.8 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction pour les fibres musculaires striées squelettiques. (A)

La libération d'acétylcholine par le motoneurone dans la fente synaptique est suivie de sa liaison sur des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, présents sur le sarcolemme. Les récepteurs nicotiniques s'ouvrent et laissent passer les ions sodium, ce qui provoque une dépolarisation du sarcolemme. La dépolarisation du sarcolemme génère un potentiel d'action qui se propage jusqu'aux tubules-T. Au niveau des tubules-T le potentiel d'action va activer le récepteur à la dihydropyridine (DHPR), qui va activer le récepteur à la ryanodine (RyR1). L'activation du RyR1 est suivie du relargage de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique dans le sarcoplasme. Le Ca^{2+} libéré se lie à la troponine, rendant accessibles les sites de liaison pour la myosine présents dans les filaments d'actine. **(B)** La contraction est le résultat d'un raccourcissement des sarcomères. Le raccourcissement des

sarcomères se fait par glissement des filaments d'actine sur les têtes de myosine. Pour ce, des molécules d'ATP viennent d'abord se lier aux têtes des myosines (1). Les myosines hydrolysent l'ATP ce qui les réorientent en position de haute énergie (2). Dans cette configuration les têtes de myosine se lient aux filaments d'actine (3). Pendant la phase d'accrochage à l'actine les têtes de myosine se replient sur elles-mêmes, entraînant dans leur mouvement les filaments d'actine et la libération de l'ADP (4). Ce déplacement consomme de l'énergie et les têtes de myosine se réorientent en position de basse énergie pour revenir en configuration initiale. Figure adaptée des sites www.apsubiology.org et <http://www.sivabio.50webs.com>

Ils possèdent 2 caractéristiques très importantes et spécifiques : ils sont présents uniquement dans les cellules du muscle strié squelettique et sont capables, à des degrés d'efficacité différents, d'initier le processus myogénique après transfection d'un autre type cellulaire (Weintraub et al. 1991).

Il est maintenant largement admis que les muscles striés squelettiques des vertébrés, à l'exception des muscles du crâne et du visage, dérivent de précurseurs présents dans les somites (Christ et Ordahl 1995). Dans un embryon de vertébré, un somite est une structure épithéliale, transitoire, de forme sphérique qui provient d'une segmentation du mésoderme paraxial. Le tissu musculaire a donc pour origine le feuillet mésodermique. Assez rapidement les somites perçoivent des signaux provenant des tissus environnants, tel que le tube neural, qui vont entraîner leur compartimentation. En partie ventrale, le somite va former le sclérotome, qui est composé de cellules mésenchymateuse. Le sclérotome permet la formation de la colonne vertébrale, des côtes, des tendons et des méninges. La partie dorsale, appelée dermomyotome, héberge les précurseurs cellulaires du derme et des muscles (Buckingham et al. 2003). Le dermomyotome peut être caractérisé par l'expression de marqueurs comme Pax3 et Pax7. Après la formation du dermomyotome, des cellules se décrochent de ses extrémités et

migrent pour former le myotome. Sa formation dépend de l'expression de Myf5. Il se compose de cellules musculaires mononucléées, différenciées, appelées myocytes. Ces cellules expriment certains marqueurs du muscle comme la desmine. Le myotome peut être considéré comme le premier muscle.

Cependant le nombre de cellules présentes dans les somites n'est pas suffisant pour assurer la formation de tous les muscles du corps. Les cellules précurseurs des cellules musculaires peuvent, soit se différencier à proximité des somites pour former le myotome puis les muscles du tronc, soit subir une étape de délamination du dermomyotome et se multiplier avant de migrer. Cette étape de prolifération est nécessaire à la formation des muscles des membres. Ces cellules en prolifération sont appelées myoblastes. Sous l'influence de signaux environnementaux, les myoblastes sortent de leur cycle cellulaire, se différencient en cellules mononucléées, appelés myocytes. C'est l'étape de différenciation. Pour se différencier les cellules sont soumises à un effet appelé « effet de communauté ». Une cellule peut entamer le processus de différenciation uniquement si elle se trouve en présence d'un nombre suffisant de cellules du même type (Gurdon, Lemaire, et Kato 1993). Cet effet de communauté est lié à la sécrétion de FGFs. Le contact entre les myoblastes est aussi nécessaire à l'activation de la différenciation myogénique, impliquant les cadhérines.

Les myocytes s'alignent et fusionnent en myotubes multinucléés, c'est l'étape de fusion. Enfin les myotubes subissent une étape de maturation pour donner naissance aux fibres musculaires fonctionnelles.

En fait, durant l'embryogénèse on distingue une myogénèse primaire, durant laquelle les précurseurs myogéniques sont appelés myoblastes embryonnaires et donnent naissance aux fibres précurseurs primaires. Pendant la myogénèse secondaire, les myoblastes fœtaux donnent naissance aux fibres musculaires précurtrices secondaires, plus petites que les fibres primaires. Ces fibres précurtrices sont à l'origine des fibres musculaires après la naissance. La croissance du muscle après la naissance ne dépend pas d'une augmentation du nombre de fibres musculaires (250 millions environ) mais d'une augmentation de leur diamètre, par synthèse de nouvelles myofibrilles. Ces modifications sont soumises à des facteurs nerveux mécaniques et hormonaux.

C2. La régénération du muscle strié squelettique

Après la naissance, les muscles squelettiques sont sujets à de nombreux stress liés à l'activité physique et à d'éventuelles lésions générées durant des accidents. Comme les fibres musculaires sont des cellules post-mitotiques, ces besoins requièrent une source renouvelable de cellules. Les cellules qui ont ces fonctions dans le muscle strié squelettique sont appelées cellules satellites. Elles représentent 2 à 5% des noyaux d'une fibre musculaire mature chez l'adulte et sont la source majeure de précurseurs myogéniques nécessaires à la régénération du muscle post-natal. Initialement quiescentes, leur potentiel prolifératif et leur capacité à se différencier donnent de grands espoirs aux thérapies cellulaires visant à réparer les muscles affectés chez les patients souffrant de dystrophies musculaires, par exemple.

Introduction

La régénération musculaire se fait en plusieurs étapes successives. Elle est toujours précédée d'une phase dégénérative, suite à une rupture irréversible du sarcolemme, par exemple. Cette phase est suivie d'une phase inflammatoire, durant laquelle le muscle lésé est envahi de macrophages et de neutrophiles. La phase inflammatoire est suivie de la phase de régénération, puis de réorganisation des fibres musculaires, qui se termine par l'innervation des fibres.

Les cellules satellites apparaissent dès la fin de l'embryogénèse. Leur quiescence est assurée par un certain nombre de facteurs, comme la myostatine, MNF β (« Myocyte Nuclear factor β ») ou Msx1. La régénération implique l'activation des cellules satellites quiescentes. Plusieurs signaux sont capables d'induire cette activation, dont l'oxyde nitrique synthétisé par des fibres musculaires stressées, lésées ou par des facteurs de croissance comme les FGFs (facteurs de croissance des fibroblastes). Une fois activées, les cellules satellites vont migrer en dehors de la lame basale, entrer en cycle de division et exprimer les facteurs de transcription Pax7 et MyoD. Les myoblastes dérivés de ces cellules activées vont effectuer plusieurs cycles de division et se séparer en deux populations. Les cellules dont l'expression de Pax7 chute, vont exprimer la myogénine, se différencier en myotubes et fusionner aux fibres pré-existantes. Dans les cellules qui continuent d'exprimer Pax7, l'expression de facteurs myogéniques est inhibée, interrompant le cycle cellulaire. Ces cellules sont supposées assurer le renouvellement des cellules satellites.

Ce mécanisme permet au muscle de se régénérer tout en conservant un potentiel de régénération future. Il a été estimé que, dans le muscle strié squelettique humain, la proportion de cellules satellites représenterait environ 15% des noyaux totaux du tissu musculaire à la naissance, entre 6% et 10% à 2 ans, 5% à 20 ans et 1,5% à 70 ans (Renault et al. 2002). La diminution de la proportion des cellules satellites serait un des facteurs liés au syndrome de vieillissement du muscle strié squelettique, appelé sarcopénie.

Chapitre n°4 : Les pathologies du muscle strié squelettique

Les pathologies affectant le muscle strié squelettique sont regroupées sous le terme de maladies neuromusculaires. Ces maladies ont des conséquences sur le développement, le maintien et le fonctionnement du muscle. On parle de maladies neuromusculaires car elles peuvent être liées aussi bien à une atteinte directe du tissu musculaire, qu'à une atteinte indirecte, par l'intermédiaire d'une altération du tissu nerveux. Les maladies dues à une déficience directe des fibres musculaires sont regroupées sous le terme de myopathies. Elles forment un groupe hétérogène comprenant à l'heure actuelle une centaine de maladies. Les myopathies peuvent avoir plusieurs origines. Elles peuvent être purement déterminées par les gènes, elles peuvent être d'origine métabolique (génétique, sporadique ou d'origine encore inconnue), d'origine hormonale (myopathie thyrotoxique, hypothyroïdienne, etc) ou d'origine inflammatoire.

Les dystrophies musculaires regroupent un ensemble de maladies d'origine génétique, caractérisées par une faiblesse et une atrophie progressive des muscles. Elles résultent de la mort des fibres musculaires qui sont remplacées par du tissu conjonctif et du tissu adipeux. Elles affectent plus souvent les hommes que les femmes. La vitesse de progression et la sévérité des symptômes varient beaucoup en fonction de la nature de la dystrophie et de l'individu. Pour ces raisons le diagnostic clinique est complexe, il comprend le contrôle de plusieurs constantes physiologiques, comme la mesure du taux sérique de la créatine kinase (CK), l'examen électrophysiologique, de l'imagerie, des tests d'efforts, la recherche de déficience en protéines, des études génétique et des études généalogiques.

Les dystrophies musculaires progressives incluent les dystrophies de Duchenne et de Becker (60% des cas de dystrophies musculaires), les dystrophies des ceintures (LGMD pour « Limb Girdle Muscular Dystrophy », 30% des dystrophies musculaires), les dystrophies musculaires distales, la dystrophie facio-scapulo-humérale de Landouzy-Dejerine, la dystrophie musculaire oculopharyngée et la dystrophie d'Emery-Dreifuss. Notre intérêt s'est porté principalement vers deux maladies, appelées LGMD1C et LGMD2B appartenant aux groupes de maladies connues sous les termes de cavéolinopathies et dysferlinopathies, respectivement. Pour comprendre les différentes origines des dystrophies musculaires la prochaine section abordera des généralités sur une structure protéique très particulière exprimée par les fibres musculaires : le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (DAPC).

A. Le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (DAPC : Dystrophin-Associated Protein Complex)

Les fibres musculaires striées squelettiques, qui sont très fréquemment sollicitées au cours de la vie et intensément sollicitées durant une activité physique, sont parmi les cellules les plus exposées à des stress mécaniques. Les forces de tensions et déformations latérales induites par la contraction affaiblissent considérablement l'intégrité structurale du sarcolemme (**Figure 4.1**).

Introduction

Pour diminuer les forces mises en jeu lors de la contraction, le sarcolemme possède un complexe protéique établissant un lien entre les sarcomères et la lame basale (Oeckler et al. 2010) (Batchelor et Winder 2006). La liaison du cytosquelette à la lame basale permet de dissiper les forces produites par sa contraction, jusqu'à la matrice extracellulaire, dont certaines protéines, comme le collagène, résistent à la déformation. La liaison du cytosquelette à la matrice extracellulaire permet aussi de stabiliser le sarcolemme et de lui donner une résistance aux contraintes de déformations liées à la contraction (**Figure 4.1D**).

Ce complexe protéique est appelé complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (DAPC). Il est formé par l'assemblage de protéines cytosoliques, transmembranaires et extracellulaires (**Figure 4.2**). Le rôle « d'amortisseur » du DAPC a été proposé par l'étude des dystrophies musculaires résultant de mutations des gènes codant des protéines composant ou associées à ce complexe (Ervasti 2007).

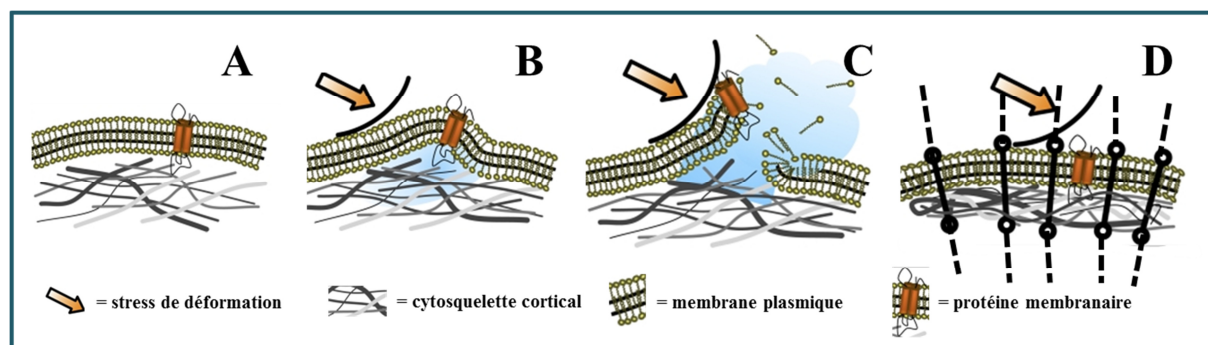


Figure 4.1 : Représentation schématisée des conséquences des stress de déformation sur une membrane plasmique. Les forces de tensions latérales induites par la contraction déforment la membrane plasmique transitoirement (**A et B**). Lorsque ces forces déforment la membrane plasmique au-delà de son seuil d'élasticité, cette dernière se rompt (**C**). La liaison du cytosquelette à la matrice extracellulaire permet aussi de stabiliser le sarcolemme et lui donner une résistance aux contraintes de déformation liées à la contraction (**D**). Figure adaptée de (Oeckler et al. 2010)

La dystrophine est une protéine cytosolique de 427kDa, élastique et flexible, appartenant à la superfamille des spectrines. Elle est codée par le gène le plus grand du génome humain (2,5 megabases soit 0,08% du génome humain). Si grand, qu'il a été montré qu'il faut aux cellules 16 heures pour le transcrire et épisser le transcrit primaire (Tennyson, Klamut, et Worton 1995). La dystrophine se lie à l'actine-F via son extrémité N-terminale et à des domaines de type spectrine dans sa partie centrale. Sa région C-terminale contient des domaines de liaison pour d'autres protéines du complexe dont le dystroglycane- β , qui est ancré dans le sarcolemme, et la dystrobrevine- α . Ces domaines comprennent un domaine WW, riche en cystéines, un domaine CC et un domaine CT.

Le DAPC est composé (**Figure 4.2**) par la dystrophine, les sarcoglycanes (α , β , δ , γ , ϵ), les dystroglycanes (α , β), la dystrobrevine, les syntrophines (α , β), le sarcospane, l'agrine et la lamine- $\alpha 2$ (ou mérosine), qui est liée aux composants de la lame basale, dont le collagène IV.

Introduction

D'autres complexes protéiques connectent le sarcolemme à la lame basale, dont les intégrines (**Figure 4.2**). De plus, certaines protéines, bien qu'à proximité spatiale du DAPC, ne sont pas associées à ce complexe. C'est le cas de la dysferline (Bansal et al. 2003) ou encore de la cavéoline-3 (Crosbie et al. 1998). Leur absence ou des mutations de leur séquence codante n'affecte pas la structure du DAPC.

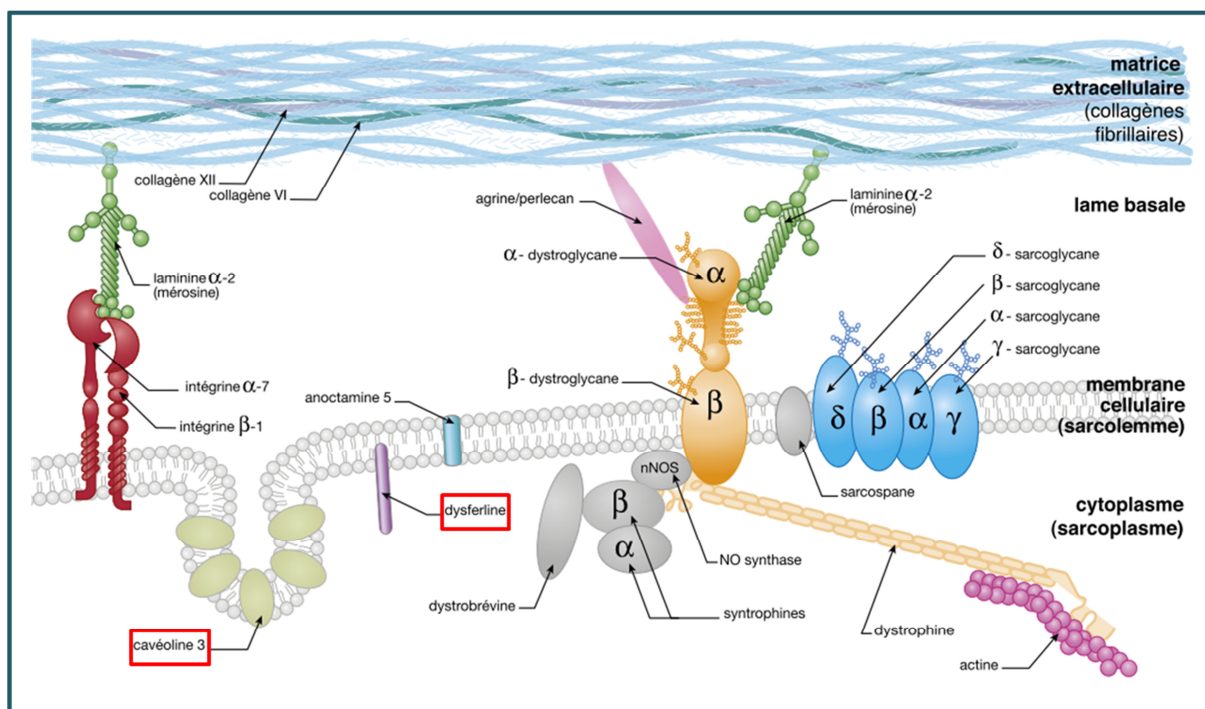


Figure 4.2 : Représentation schématique du Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (DAPC) et des principales protéines associées aux différentes formes de dystrophies musculaires. Certaines protéines, bien qu'à proximité spatiale du DAPC, ne sont pas associées à ce complexe (encadrées en rouge). C'est le cas de la dysferline ou encore de la cavéoline-3. L'absence de leur expression ou leur mutation n'affecte pas la structure du DAPC. Figure tirée du site <http://www.myobase.org/>.

Le DAPC est connecté aux sarcomères au niveau des disques Z via son interaction avec la desmine, une protéine de filaments intermédiaires (Poon et al. 2002) (**Figure 4.3 et cf Figure 3.4**).

Beaucoup de dystrophies musculaires sont la conséquence d'une altération de la structure du DAPC ou des protéines associées. Cette altération résulte de l'expression d'une forme anormale ou de l'absence d'expression d'une protéine constituant ce complexe. Ainsi, les dystrophies de Duchenne et Becker sont la conséquence de l'absence d'expression et de l'expression d'une forme tronquée de la dystrophine, respectivement. Les dystrophies musculaires congénitales (sauf celles du groupe 3) sont dues à des anomalies de glycosylation du dystroglycane- α ou des altérations des protéines de la matrice extracellulaire et de la laminine- α 2. Plusieurs formes de dystrophies des ceintures résultent aussi d'une altération de la structure de ce complexe. L'affaiblissement du DAPC dans le cas de ces dystrophies.

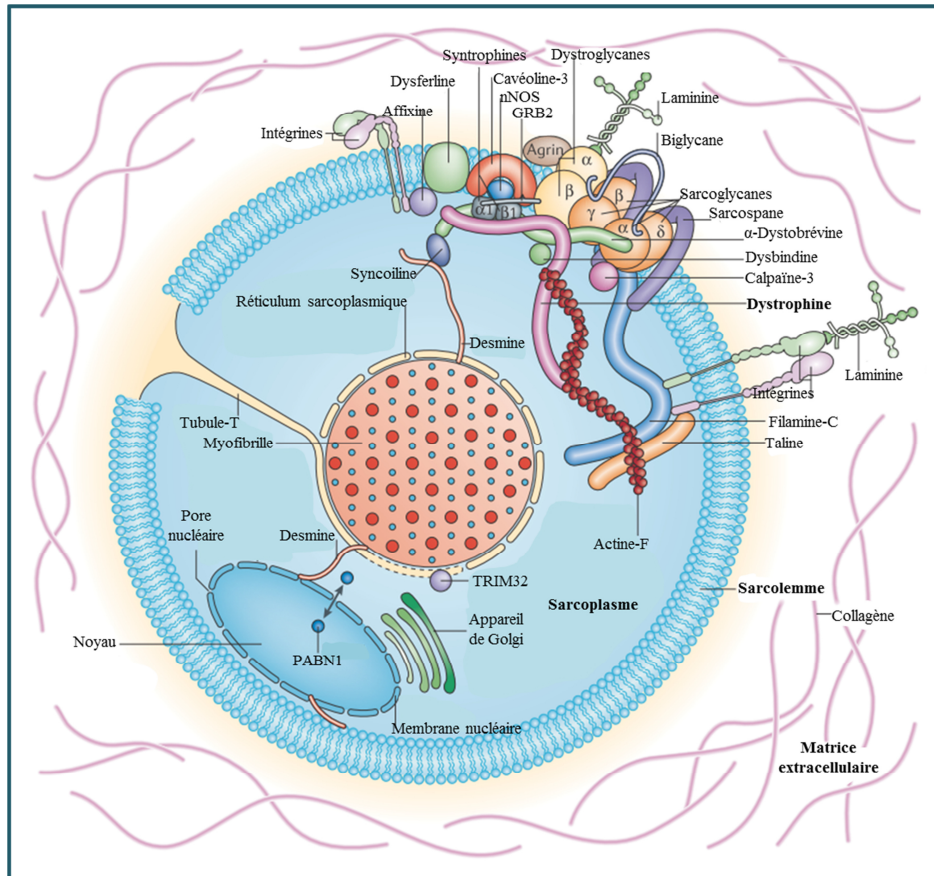


Figure 4.3 : Représentation générale du DAPC et de sa liaison aux sarcomères via la desmine. Le DAPC est connecté aux sarcomères au niveau des disques Z via l'interaction du DAPC avec la desmine, une protéine de filaments intermédiaires. Figure adaptée de (Davies et Nowak 2006).

musculaires entraîne une augmentation de la fréquence des événements de ruptures du sarcolemme des fibres musculaires qui ne peuvent plus conserver leur intégrité et meurent rapidement. Au début des années 2000, il a été démontré que certaines dystrophies musculaires, comme les myopathies de Miyoshi (dystrophies distales) ou la dystrophie musculaire des ceintures de type 2B (LGMD2B), englobées sous le terme de dysferlinopathies, ont pour origine un défaut de réparation de la membrane plasmique (Bansal et al. 2003). Dans ce cas, les cellules musculaires subissent des ruptures membranaires avec la même fréquence que des cellules musculaires saines, mais elles sont incapables de les réparer. Un autre groupe de myopathies, dont fait partie la dystrophie musculaire des ceintures de type 1C, ont pour origine des mutations de la séquence codant la cavéoline-3 et sont regroupées sous le terme de cavéolinopathies. Depuis qu'il a été montré que la cavéoline-3 peut être associée à la dysferline (C. Matsuda et al. 2001), il est suggéré que ces pathologies soient aussi directement liées à un défaut de réparation du sarcolemme. Aucun résultat expérimental n'a encore permis de valider cette hypothèse.

B. Les dystrophies des ceintures (Limb-Girdle Muscular Dystrophy)

Les dystrophies des ceintures regroupent les pathologies affectant prioritairement les muscles des ceintures scapulaire et pelvienne. A ce jour, 24 formes ont été caractérisées par l'identification des mutations génétiques responsable de la maladie. La prévalence mondiale de toutes les LGMD est estimée entre 1 à 9 pour 1 000 000 de personnes (sources orphanet). Une nomenclature des LGMD a été proposée au milieu des années 1990 (K M Bushby 1995). Elle repose sur le code suivant : LGMD^{NL}, avec N correspondant au mode de transmission (1 : dominant ; 2 : récessif) et L à une lettre de l'alphabet, l'ordre alphabétique indiquant la chronologie de découverte de la maladie. Les formes autosomiques dominantes sont moins nombreuses et plus rares que les formes autosomiques récessives.

Les formes autosomiques dominantes : 8 LGMD1 sont actuellement répertoriées. Pour 5 d'entre elles, les gènes et protéines impliqués dans la pathologie ont été identifiés, pour les autres, seul le locus est connu. Elles sont souvent associées à une sévérité modérée mais peuvent induire une anomalie du muscle cardiaque et des problèmes respiratoires.

Les formes autosomiques récessives : Les LGMD2 forment un groupe de maladies plus vaste que celui des formes dominantes, avec 16 LGMD2 répertoriées. Quatre mécanismes physiopathologiques peuvent être distingués parmi ces maladies : 1) une instabilité du sarcolemme, 2) des défauts de réparation du sarcolemme, 3) une sénescence des cellules satellites et 4) une déstructuration du sarcomère.

C. Les myopathies distales

Les myopathies distales (MD) sont des pathologies affectant les muscles distaux des membres supérieurs et/ou inférieurs. De la même manière que pour les LGMD, certaines MD sont transmises de façon autosomique dominante (15 maladies connues) et d'autres sont transmises de manière autosomique récessive (6 formes) (Udd 2012). Les formes dominantes sont d'expression tardive (après 40 ans), alors que les formes récessives débutent plus précocement, généralement avant 25 ans. Les manifestations cliniques de ces maladies vont d'une simple fatigabilité jusqu'à une possible perte de la marche. D'autres symptômes comme une faiblesse des muscles des cordes vocales et/ou du pharynx, entraînant des difficultés de phonation, sont également observés.

D. Les dysferlinopathies

Les travaux de plusieurs équipes, menés dans les années 90, ont permis d'identifier le locus responsable d'une des LGMD2 : la LGMD2B. Les premiers travaux publiés rapportent son positionnement par des études de liaison sur le chromosome 2p13. Au cours de la même période, il a aussi été montré que le locus était impliqué dans une autre pathologie, une forme de myopathie distale appelée myopathie de Miyoshi (R. Bashir et al. 1994)(Bejaoui et al.

1995). Des études par clonage positionnel ont alors identifié le gène DYSF, codant la dysferline, comme responsable de cette pathologie (Rumaisa Bashir et al. 1998) (Liu et al. 1998). La prévalence des dysferlinopathies est estimée à 2 cas pour 1000 000 de personnes, soit 12 000 cas dans le monde environ (Gaëlle Blandin 2014). Elles représentent une part de plus en plus importante des myopathies diagnostiquées chez l'adulte avec des proportions plus marquées au Maghreb et au Moyen-Orient.

Les dysferlinopathies ont la particularité de regrouper plusieurs tableaux cliniques, sans que les causes de ces variations ne soient connues. La myopathie de Miyoshi de type 1 (MMD1) et la LGMD2B représentent la très grande majorité des pathologies associées à une déficience en dysferline. Les autres dysferlinopathies sont classées dans des tableaux cliniques rares. Ces pathologies partagent de nombreuses similarités, comme un taux très élevé de CK sérique, l'âge d'apparition des symptômes (début de l'âge adulte) et la progression lente de la pathologie, conduisant à la perte de la marche au terme de plusieurs années. Elles sont en revanche très différentes suivant les groupes de muscles affectés. Dans certains cas, avant l'apparition des symptômes, certains malades possèdent de très bonnes capacités sportives. Ce caractère n'est pas retrouvé pour les autres dystrophies. Une atteinte cardiaque ou respiratoire est très exceptionnelle dans les dysferlinopathies à la différence de beaucoup de myopathies (Wenzel et al. 2007). Cependant des investigations cardiologiques approfondies (IRM) ont mis en évidence une fréquence élevée de petites anomalies, à la fois dans le modèle murin et pour des patients souffrant de LGMD2B (Rosales et al. 2011). La LGMD2B apparaît habituellement à l'adolescence ou chez le jeune adulte. Elle débute par une faiblesse musculaire des jambes entraînant des difficultés pour courir, monter les escaliers ou se relever du sol. Elle est caractérisée par une atrophie des muscles des ceintures pelviennes et scapulaires, avec une progression lente de la fonte musculaire. Au niveau scapulaire, le biceps est le plus touché, le deltoïde pouvant être à l'inverse hypertrophié. Ces atteintes peuvent être asymétriques.

La myopathie de Miyoshi de type 1 est la plus fréquente des myopathies distales. Elle se transmet selon le mode autosomique récessif, tout comme la LGMD2B. Elle débute vers l'âge de 20 ans et se caractérise par une atteinte préférentielle de la loge postérieure de mollets (muscles gastrocnémiens et soléaires). A l'inverse des autres myopathies distales, l'élévation des CK est très marquée. Elle touche aussi les muscles des avant bras sans affecter les mains. La progression de cette pathologie est lente, et peut s'étendre aux cuisses. Il existe trois types de myopathies de Miyoshi. Chacun des types provient de mutations sur des gènes différents.

Le type 2 concerne une protéine, qui n'a pas encore été identifiée, codée par un gène présent sur le chromosome n°10 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100505381>). Le type 3 concerne des mutations sur le gène codant la protéine Actonamine 5, qui est un canal chlorure activé par le calcium, faisant partie de la famille des Actonamine.

Plus de 400 modifications de séquence sont aujourd'hui répertoriées sur le gène DYSF. En 2012 266 étaient rapportées comme délétères (Blandin et al. 2012). Ces mutations sont réparties tout au long de la séquence codante, sans qu'aucune région surreprésentée (hot-spot) ne soit identifiée. Aucune corrélation des zones mutées avec le phénotype observé n'a également été constatée. Les mutations délétères sont de tous les types. Les mutations

ponctuelles représentent 50% des mutations délétères avec dans la plupart des cas une absence d'expression de la protéine.

Une découverte faite avec sérendipité a apporté des informations importantes pour l'étude de ces pathologies. Il a été en effet observé chez une patiente porteuse d'une mutation ayant pour conséquence l'expression d'une forme de dysferline tronquée proche de la minidysferline_{c72} associée au développement d'une forme très modérée de dysferlinopathie, partiellement handicapante. Que l'expression transgénique de cette forme de dysferline dans des souris modèles de dysferlinopathie restaure la capacité des fibres musculaires striées squelettiques à réparer des ruptures mécaniques de leur sarcolemme (Krahn et al. 2010). Ceci confirme le rôle important de la minidysferline_{c72} dans la réparation membranaire observée *in vitro* et ouvre la voie au développement d'une thérapie génique basée sur l'expression d'une forme tronquée de dysferline. De manière plus surprenante, l'expression transgénique de cette forme tronquée de dysferline n'empêche pas les souris modèles de développer la pathologie. Ces résultats montrent que le défaut de réparation membranaire n'est pas le seul facteur contribuant au développement des dysferlinopathies et il est envisageable que la partie manquante de la dysferline participe à d'autres événements encore inconnus, mais nécessaires à la survie des fibres musculaires.

Pour ce travail de thèse nous avons utilisé une lignée humaine élaborée à partir de myoblastes extraits par biopsie d'un triceps d'une femme âgée de 25 ans atteinte LGMD2B. Pour cette patiente la mutation est une substitution d'une thymidine par une adénine en 5' de l'intron 26 pour les 2 allèles du gène codant la dysferline. Cette mutation ponctuelle qui touche un site d'épissage a pour conséquence une absence complète de l'expression de la dysferline que ce soit dans les myoblastes et myotubes des cultures primaires parentales ou de la lignée immortalisée (Philippi et al. 2012). Malgré cette absence de dysferline, et à l'instar de la lignée LHCN-M2, l'expression de protéines marqueurs de la myogénèse comme la chaîne lourde de myosine, la desmine ou encore la caveoline-3 n'est pas affectée. Cette lignée humaine nous a servi de modèle d'étude de muscle strié squelettique déficient en dysferline.

E. Les cavéolinopathies

Les cavéolinopathies regroupent un ensemble de pathologies ayant en commun des mutations de la séquence codant la cavéoline-3 et la séquence codant la cavine-1 (Ardisson et al. 2013)). Les déficiences en cavéoline-3 ont en commun une diminution significative de la présence de cavéoline-3 dans le sarcolemme des fibres musculaires. Cette diminution de la quantité de cavéoline-3 dans le sarcolemme a pour conséquence, en général, une désorganisation du réseau des tubules-T ainsi qu'une altération des voies de signalisation cellulaire (Gazzerro et al. 2010). En 2010, 30 mutations délétères du gène codant la cavéoline-3 étaient répertoriées. La plupart des cavéolinopathies sont transmises selon un mode autosomique dominant. Cependant, des cas de transmissions autosomiques récessives ont été rapportés (Bruno et al. 1993) pour 6 des mutations identifiées (Gazzerro et al. 2010)

(Tableaux 1 et 3, mutations marquées avec le symbole *). La mutation de la séquence codant cette protéine sur un seul allèle est suffisante pour que la protéine n'exerce plus ses fonctions dans les fibres musculaires. Des études ont rapporté dans le cas de mutations comme p.P104L, p. Δ TFT 63-65, p.R27Q et p.T77K, qu'une proportion significative de la cavéoline-3 exprimée par les fibres musculaires forme des agrégats de masse moléculaire importante qui sont ségrégués dans la membrane des saccules golgiennes (F. Galbiati et al. 1999) (Ferruccio Galbiati et al. 2000). Le fait que la mutation d'un seul allèle, soit suffisante pour entraîner le développement d'un phénotype pathologique, pourrait être dû au fait que les cavéoline-3 mutées soient capables de retenir les protéines sauvages, exprimées par l'allèle non muté, dans le compartiment Golgien. Néanmoins, le fait que les phénotypes pathologiques des mutations homozygotes soient plus modérés, suggèrent que la présence d'une faible proportion de cavéoline-3 au niveau du sarcolemme pourrait atténuer l'impact de la déficience en cavéoline-3 chez les formes hétérozygotes (Kubisch et al. 2003). Comme dans le cas des dysferlinopathies, il n'a pas été trouvé de lien direct entre les atteintes pathologiques et la localisation des mutations délétères. Celles-ci sont réparties tout le long de la séquence codant la cévoline-3 et une même mutation peut être la cause de manifestations cliniques très différentes, entre des individus de familles différentes ou au sein d'une même famille (Fee et al. 2004)

Introduction

Mutation identifiée dans la séquence codante	Modification de la séquence protéique correspondante	Phénotype pathologique associé	Référence des études
Dans le domaine N-Terminal			
c.77G>A	p.R27Q	LGMD	(Figarella-Branger et al. 2003)
c.77G>A	p.R27Q	LGMD, RMD	(Fee et al. 2004)
c.81C>A	p.D28E	LGMD, RMD, DM	(Fischer et al. 2003)
c.96C>G	p.N32K	LGMD	(Sugie et al. 2004)
c.114+2T>C*	p.K37X	LGMD	(Müller et al. 2006)
c.128T>A	p.V43E	LGMD	(Sugie et al. 2004)
c.133G>A	p.A45T	LGMD	(Herrmann et al. 2000)
c.163G>A	p.G55S	LGMD	(McNally et al. 1998)
Dans le domaine d'oligomérisation			
c.183C>A	p.S60R	LGMD, H-CK	(Fulizio et al. 2005)
c.187A>C	p.T63P	LGMD	(C. Matsuda et al. 2001)
c.187_194del	p.TFT63-65del	LGMD	(Minetti et al. 1998)
c.216C>G	p.C71W	LGMD	(McNally et al. 1998)
Dans le domaine d'ancrage à la membrane			
c.233C>T*	p.T77M	LGMD	(Monica Traverso et al. 2008)
c.277G>A*	p.A92T	LGMD-RMD	(Kubisch et al. 2003)
c.290_293del	p.F96del	LGMD, RMD, H-CK	(Cagliani et al. 2003)
c.314C>T	p.P104L	LGMD	(Minetti et al. 1998)

Tableau n°1 : Les mutations de la cavéoline-3 identifiées chez les patients atteints de LGMD1C. Le phénotype pathologique n'est pas associé à la localisation de la mutation sur la séquence codant la cavéoline-3 puisque des mutations sur toute la séquence codante entraînent la même maladie. LGMD = LGMD1C, RMD = Rippling Muscle Disease, H-Ck = HyerCKémie. Le symbole « , » signifie que plusieurs maladies peuvent être observées pour la même mutation au sein d'une même famille, le symbole « -> » indique des cas de patients souffrant de plusieurs pathologies à la fois. * = mutations homozygotes. D'après (Gazzerro et al. 2010)

Introduction

Mutation identifiée dans la séquence codante	Modification de la séquence protéique correspondante	Phénotype pathologique associé	Référence des études
Dans le domaine N-Terminal			
c.77G>A	p.R27Q	H-CK(s)	(Carbone et al. 2000)
c.83C>T	p.P29L	H-CK(f)	(Merlini et al. 2002)
c.99>G	p.N34K	H-CK(s), DM	(Fulizio et al. 2005)
Dans le domaine d'oligomérisation			
c.169G>A	p.V57M	H-CK(s), H-CK(f)	(Reijneveld et al. 2006) (Alias et al. 2004)
Dans le domaine d'ancrage à la membrane			
c.233C>A	p.T78K	H-CK(s)	(M. Traverso et al. 2008)
c.233C>T	p.T78M	H-CK(s)	(Alias et al. 2004)

Tableau n°2 : Les mutations de la cavéoline-3 identifiées chez les patients atteints de HyperCKémie idiopathique. H-CK = HyperCKémie, DM = myopathie distale, (s) = cas sporadique, (f) = cas familial. D'après (Gazzerro et al. 2010).

Mutation identifiée dans la séquence codante	Modification de la séquence protéique correspondante	Phénotype pathologique associé	Référence des études
Dans le domaine N-Terminal			
c.13InsG/c.114_453del	p.E4fs19X	RMD	(M. Traverso et al. 2008)
c.77G>A	p.R27Q	RMD	(Vorgerd et al. 2001)
c.82C>A	p.P29T	RMD	(Van den Bergh et al. 2004)
c.133G>A	p.A46T	RMD	(R. C. Betz et al. 2001)
c.134C>T	p.A46V	RMD	(R. C. Betz et al. 2001)
c.136G>A	p.E47K	RMD	(Madrid, Kubisch, et Hays 2005)
c.140A>C	p.E47A	RMD	(Lorenzoni et al. 2007)
Dans le domaine d'oligomérisation			
c.154A>G	p.S53G	RMD	(Dotti et al. 2006)
c.212C>A*	p.W71X	RMD	(Ueyama et al. 2007)
Dans le domaine d'ancrage à la membrane			
c.257T>C*	p.L86P	RMD	(Kubisch et al. 2005)
c.307_312del	p.F104_F105del	RMD	(Bae et al. 2007)

Tableau n°3 : Les mutations de la cavéoline-3 identifiées chez les patients atteints de Syndrome du muscle roulant (Rippling Muscle Disease). * = mutation homozygote. D'après (Gazzerro et al. 2010).

Introduction

Mutation identifiée dans la séquence codante	Modification de la séquence protéique correspondante	Phénotype pathologique associé	Référence des études
Domaine N-Terminal			
c.39C>A	p.V15L	SIDS	(Cronk et al. 2007)
Domaine d'ancrage à la membrane			
c.233C>T	p.T78M	LQTS	(Vatta et al. 2006)
c.239T>A	p.L80R	SIDS	(Cronk et al. 2007)
c.253G>A	p.A86T	LQTS	(Vatta et al. 2006)
c.290T>G	p.F98C	LQTS	(Vatta et al. 2006)
Domaine C-Terminal			
c.423C>G	p.S141R	LQTS	(Vatta et al. 2006)

Tableau n°4 : Les mutations de la cavéoline-3 identifiées chez les patients atteints de Syndrome QT long congénital ou du Syndrome de la mort subite du nourrisson, 2 pathologies associées à une arythmie héréditaire. LQTS = Syndrome du QT long congénital ; SIDS = Syndrome de mort subite du nourrisson. D'après (Gazzerro et al. 2010).

Les tableaux n°1 à 4 sont tirés d'une revue faisant la synthèse des mutations de la séquence codant la cavéoline-3, répertoriées dans la littérature, ainsi des principales maladies associées (Gazzerro et al. 2010). Les cavéolinopathies englobent un ensemble de pathologies très différentes. Ces maladies sont :

- **la LGMD1C (Tableau n°1)** : cette forme de dystrophie des ceintures apparaît généralement à la petite enfance, même si des cas rares de personnes adultes ont été rapportés dans la littérature (Figarella-Branger et al. 2003). Cette forme de dystrophie est notamment associée à une faiblesse progressive des ceintures musculaires (pelvienne ou scapulaire), un taux élevé de Créatine Kinase (CK) sérique et un profil normal en analyse électromyographique.

- **L'HyperCKémie (Tableau n°2)** : des taux élevés en CK sériques existent dans de nombreux cas de dystrophies musculaires, mais aussi dans des cas d'alcoolisme, de désordres inflammatoires non musculaires ou de désordres métaboliques. L'hyperCKémie isolée est une maladie associée à un taux élevé de CK sérique sans que des atteintes musculaires puissent être observées. Dans le cas des hyperCKémie cavéolinopathiques, on dénombre des cas isolés dans des familles (**Tableau n°2, s**), mais aussi des cas d'hyperCKémie familiales (**Tableau n°2, f**). La plupart des mutations sont soit sporadiques, soit familiale. On note néanmoins que des mutations retrouvées dans des cas sporadiques et familiales à la fois existent (p.V57M).

- **Le syndrome du muscle roulant (Rippling Muscle Disease) (Tableau n°3)** : Le RMD est une forme de myopathie bénigne avec des symptômes d'hyperexcitabilité musculaire indépendamment d'une activité électrique. Dans ce syndrome, les muscles se contractent par des stimuli mécaniques, comme l'application d'une pression ou d'un étirement sur le muscle. On parle de muscle roulant car la contraction est initiée au point du stimulus et se développe tout le long du muscle.

- **Des désordres d'arythmies cardiaques congénitales**, comme le syndrome du QT long et le syndrome de mort subite du nourrisson (**Tableau n°4**). Quatre mutations différentes du gène codant la cavéoline-3 ont été identifiées chez 905 patients souffrant de syndrome de long QT (LQTS) congénital de type 9. Ce syndrome résulte d'une anomalie électrophysiologique du

Introduction

cœur. Les personnes affectées par cette anomalie ou trouble du rythme cardiaque peuvent avoir un rythme cardiaque élevé, appelé "Torsade de Pointes" (TdP), qui mène à la perte soudaine de conscience et peut causer la mort subite d'origine cardiaque. Le nom du syndrome du long QT se rapporte à l'intervalle QT, qui est le temps requis pour la dépolarisation et repolarisation des cardiomyocytes ventriculaires.

Trois mutations du gène codant la cavéoline-3 ont été identifiées pour 133 syndromes de mort subite du nourrisson (SIDS). La cause des SIDS reste encore inconnue. Cependant, dans le cas des SIDS associés à des mutations de la séquence codant la cavéoline-3, il a été rapporté une augmentation d'un facteur 5 des courants sodiques tardifs. Ces désordres d'excitabilité cardiaque liés à des mutations du gène codant la cavéoline-3 indiquent que la cavéoline-3 directement ou indirectement, via les cavéoles, pourrait avoir un rôle dans l'excitabilité des cardiomyocytes.

D'autres pathologies, plus rares, ont été identifiées comme associées à des mutations de la séquence codant la cavéoline-3 : une forme de myopathie distale et des cas de cardiomyopathies hypertrophiques familiales.

Pour une même mutation, il a été rapporté des différences pathologiques importantes entre les membres d'une même famille, certains individus cumulant plusieurs pathologies, d'autres ayant une même maladie mais avec des sévérités différentes et des individus étant asymptomatiques (pénétrance incomplète) (Fee et al. 2004), (Fischer et al. 2003). Ces observations ont fait émettre l'hypothèse que des gènes perturbateurs pourraient exister, comme dans le cas de mutations du gène codant l'AnxA6, associées à des formes sévères de dystrophies des ceintures,

Une mutation de la cavine-1, une protéine indispensable à l'assemblage des cavéoles, est responsable d'une forme de lypodystrophie congénitale généralisée (de type 4). La transmission de cette maladie est autosomale récessive et le patient identifié a une très faible proportion de tissu adipeux, avec un taux de triglycérides circulants élevé, une intolérance au glucose, une hyperinsulinémie, un taux élevé de CK sérique et souffre de douleurs musculaires. Les analyses en immunohistochimie des fibres musculaires ont mis en évidence la présence de cavéoline-3 au niveau du sarcolemme, malgré l'absence de cavine-1, mais une délocalisation partielle dans le cytosol en comparaison à des patients sains.

Pour notre étude, nous avons utilisé une lignée générée à partir de myoblastes extraits du muscle vaste latéral d'un homme âgé de 44 ans et atteint de LGMD1C. Pour ce patient, la mutation identifiée est une mutation faux sens entraînant un changement de la séquence protéique p.R27Q et a pour conséquence une diminution significative de l'expression de caveoline-3 (Timmel et al. 2015). Cette lignée a constitué notre modèle de fibres musculaires striés squelettiques cavéolinopathiques.

Chapitre n°5 : Le placenta

A. Présentation générale

Le terme placenta est un terme latin qui signifie galette. Cet organe unique a été nommé ainsi en raison de sa forme circulaire (**Figure 5.1**). A terme, il a une forme de disque de 18 à 20 cm de diamètre, de 4 à 5 cm d'épaisseur au centre et 4 à 6 mm sur les bords, pour une masse comprise entre 450g et 500g environ. C'est un organe très particulier qui n'est retrouvé que chez les mammifères appartenant à la sous-classe des euthériens (ou placentaires). Cette sous-classe de mammifères est la plus représentée sur notre planète. La caractéristique commune à toutes les espèces euthériennes est que le développement des embryons se fait entièrement dans le corps de la femelle en gestation. Les embryons/fœtus se développent et sont alimentés grâce aux annexes dont fait partie le placenta.

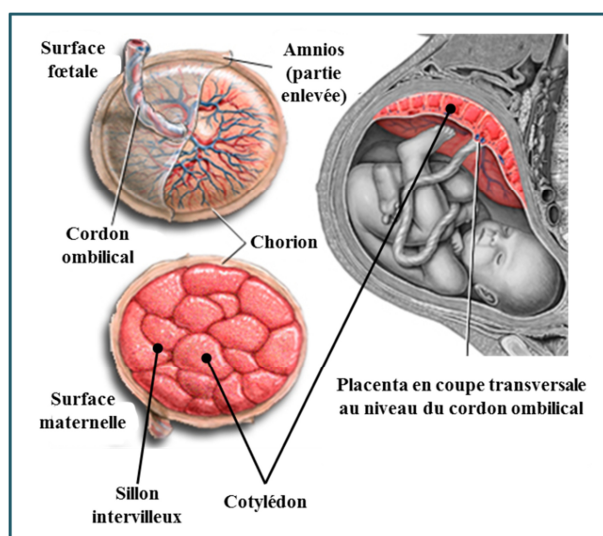


Figure 5.1 : Représentation schématique et localisation du placenta humain. Le placenta est un organe en forme de disque avec une partie fœtale appelée chorion, de laquelle émerge le cordon ombilical et une partie maternelle divisée en plusieurs lobules appelés cotylédons. Figure adaptée de www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/17010.htm

Le placenta est un organe écotone : il possède une partie fœtale et une partie maternelle. C'est un organe très riche en vaisseaux sanguins, qui régulent les échanges entre le sang maternel et le sang fœtal/embryonnaire. Il possède, à la fois, une fonction nutritive, respiratoire, excrétrice et de glande. La partie fœtale du placenta est nommée chorion. La partie maternelle est appelée decidua ou caduque.

Le placenta est caractérisé chez l'Homme par son activité de glande endocrine polyvalente, avec la production d'une grande variété d'hormones qui lui permet de contrôler l'activité et le développement de plusieurs cibles (A. Malassiné, Frendo, et Evain-Brion 2003). Il produit des hormones stéroïdiennes, comme la progestérone et des oestrogènes, ainsi que 8 hormones peptidiques, dont la gonadotrophine chorionique humaine (hCG), le lactogène placentaire humain (hPL ou hCS) ou l'hormone de croissance placentaire (PGH). Ces dernières sont

produites en grande quantité, sans équivalent connu chez les mammifères. Ces hormones sont indispensables à la fois pour le développement du fœtus/embryon mais aussi, à l'adaptation du corps de la femelle en gestation au développement du fœtus/embryon. La perméabilité du placenta aux anticorps maternels et l'absence de molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité à sa surface, permet de conférer au fœtus/embryon une immunité passive, sans être la cible du système immunitaire maternel, avant qu'il développe son propre système immunitaire.

B. Structure du placenta mature

Le placenta mature est composé de tissu fœtal, dérivé du sac chorionique, et de tissu dérivé de l'endomètre maternel. De manière générale, la partie fœtale du placenta est appelée plaque chorionique (**Figure 5.2**). Elle est recouverte par l'amnios. Elle comprend les vaisseaux sanguins fœtaux, qui sont des prolongements radiaux des vaisseaux du cordon ombilical, du tissu mésenchymateux, qui entoure ces vaisseaux, ainsi qu'une couche de cytotrophoblastes et une couche de syncytiotrophoblastes.

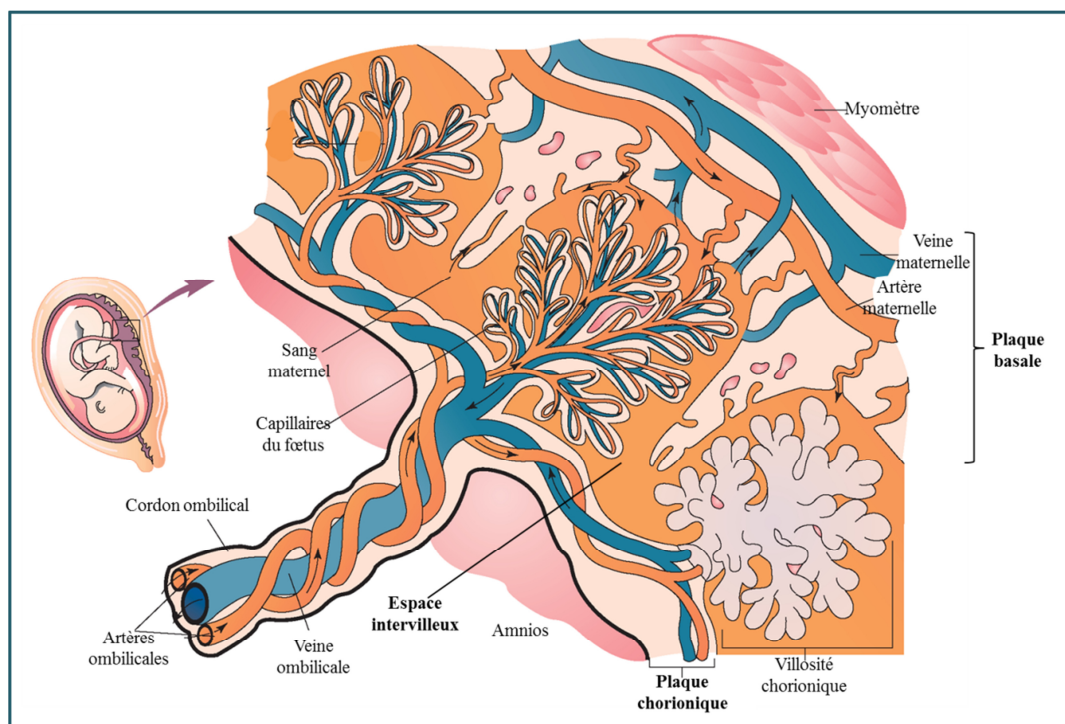


Figure 5.2 : Organisation structurale du placenta mature. La partie fœtale du placenta est appelée plaque chorionique, elle est recouverte par l'amnios et comprend les vaisseaux sanguins fœtaux, qui sont des prolongements radiaux des vaisseaux du cordon ombilical, du tissu mésenchymateux, entourant ces vaisseaux, ainsi que du tissu trophoblastique. La partie maternelle est appelée plaque basale. Entre ces deux plaques se trouve l'espace intervilloux qui contient les unités fonctionnelles du placenta branchées sous forme de villosités contenant les vaisseaux sanguins du fœtus. Figure adaptée à <http://what-when-how.com>

La partie maternelle est appelée plaque basale. Elle est recouverte par la caduque basale et elle est composée d'une couche basale résiduelle (endomètre), d'une coque cytotrophoblastique et d'une couche de syncytiotrophoblastes. Entre ces deux plaques se trouve l'espace intervilloux ou chambre intervillieuse (**Figure 5.2**). Cette chambre contient les unités fonctionnelles du placenta, sous forme de villosités. Les villosités contiennent les vaisseaux sanguins du fœtus. Dans un placenta mature, soit 5 mois post-fécondation, l'endomètre sépare de façon incomplète les villosités en unités appelées cotylédons en formant des sillons (**Figure 5.1**). L'espace intervilloux est entièrement délimité par la double couche de cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes. Le sang maternel circulant pénètre dans cet espace via des artères spiralées. Il baigne les villosités et repart par les veines endométriales. La barrière placentaire correspond aux feuillets de cellules qui séparent le sang maternel du sang fœtal circulant dans les villosités, au niveau de l'espace intervilloux. Chez l'Homme, le placenta a une structure complète à partir du 5^{ème} mois de gestation. Cette maturation se caractérise par la formation de septa ou sillons intervilloux qui séparent partiellement l'espace intervilloux, en cotylédons (**Figure 5.1**). Après cette période la croissance du placenta est uniquement une augmentation de taille. La croissance morphologique du placenta est considérable durant la période de gestation. Chez l'Homme, la surface d'échange entre l'embryon et la mère a été estimée à 0,3 m² après 12 semaines de gestation, plus de 1 m² après 16 semaines de gestation et 14 m² à terme (Benirschke, Burton, et Baergen 2012).

C. Développement du placenta : placentation

Le placenta est le premier organe apparaissant durant l'embryogénèse chez les mammifères. Son développement est appelé placentation. La placentation commence durant la première semaine du développement embryonnaire. Dans cette période, l'ovocyte se transforme progressivement en blastocyste, au cours de sa migration le long des trompes de Fallope. A ce stade, la couche de cellules externe du blastocyste, appelée zone pellucide, se rompt (J5 à J7) et provoque la polarisation de l'embryon avec l'apparition d'un pôle chorionique, appelé trophoblaste. Ce pôle chorionique donne les annexes, dont fait partie le placenta, et un pôle interne, sous la zone pellucide, appelé embryoblaste, qui devient le fœtus.

Le placenta humain et des primates supérieurs est dit hémomonochorial, car il est caractérisé par l'invasion de l'endomètre utérin par les trophoblastes du pôle chorionique, conduisant au contact direct entre les trophoblastes et le sang maternel (Benirschke, Burton, et Baergen 2012). Le développement du placenta est initié par l'entrée en phase de prolifération du trophoblaste, lorsque le blastocyste adhère à l'endomètre, à la fin de la première semaine du développement embryonnaire. De manière très simplifiée, l'adhésion du zygote polarisé est suivie d'une phase de nidation durant laquelle le blastocyste pénètre dans l'endomètre. Une série de changements morphologiques et biochimiques synchronisés de l'endomètre, contrôlés par le trophoblaste, va permettre le développement du placenta. Ces changements sont connus sous le terme de réaction déciduale. Durant cette implantation dans l'endomètre, le trophoblaste commence à se différencier pour donner naissance à deux feuillets de cellules : le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste. Ce dernier est le feuillet le plus externe. 10 jours

Introduction

après fécondation environ les cellules du trophoblaste s'étendent dans la décidue, en direction des capillaires sanguins maternels, pour former les villosités trophoblastiques primaires. Le syncytiotrophoblaste, via son activité enzymatique, érode la paroi des capillaires. Les capillaires sanguins s'anastomosent avec les lacunes du trophoblaste, pour former les sinusoides maternels. A terme, ces lacunes communiquent entre elles pour former des chambres intervillueuses, délimitées par du syncytiotrophoblaste. Le mésenchyme extra-embryonnaire envahit les villosités primaires pour former les villosités secondaires. Après trois semaines de gestation, le mésenchyme se différencie en vaisseaux sanguins pour former les villosités tertiaires. La fonction principale de ces villosités est d'assurer les échanges entre le sang fœtal et le sang maternel.

Dans le cas du placenta humain, le trophoblaste se différencie selon deux voies indispensables au fonctionnement normal du placenta (A. Malassiné, Frendo, et Evain-Brion 2003) (**Figure 5.3**).

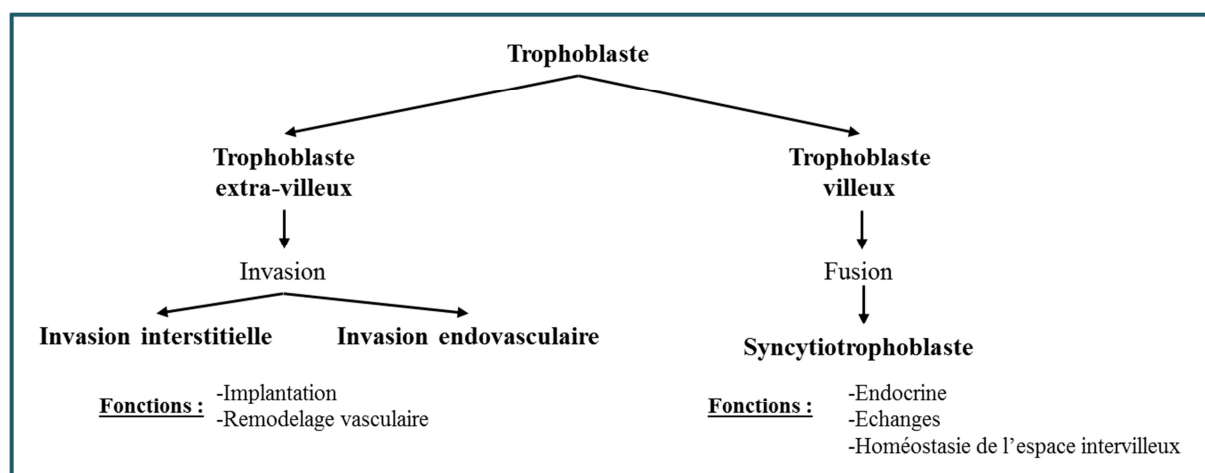


Figure 5.3: Représentation schématique des voies de différenciation des cellules trophoblastiques humaines. Dans le cas du placenta humain, le trophoblaste se différencie selon deux voies. La première voie est la voie du trophoblaste villex dans laquelle les trophoblastes fusionnent pour former les syncytiotrophoblastes. L'évagination du syncytiotrophoblaste dans la caduque initie la formation des villosités. Le syncytiotrophoblaste assure les échanges entre le sang maternel et le sang fœtal, mais également la production hormonale placentaire. Dans la voie extravillueuse, 13 jours après fécondation, des cytotrophoblastes pénètrent le syncytiotrophoblaste et forment des colonnes continues de cellules. Ces cellules, soit envahissent progressivement la decidue et le myomètre et se différencient en cellules géantes plurinucléées du placenta (voie interstitielle), soit remodelent les artères utérines (voie endovasculaire). D'après (Gude et al. 2004)

Dans la voie des trophoblastes villex, les cytotrophoblastes bordant les villosités chorioniques mésenchymateuses se différencient pour former les syncytiotrophoblastes. Ce feuillet de syncytiotrophoblastes a un rôle important tout le long de la période de gestation puisque il est le site de nombreuses fonctions placentaires incluant les échanges gazeux, ioniques et de nutriments, ainsi que la synthèse d'hormones peptidiques et stéroïdiennes. Parmi les hormones sécrétées par les syncytiotrophoblastes, la progestérone et l'hCG sont

Introduction

indispensables à la gestation humaine. A la fin du premier trimestre les syncytiotrophoblastes baignent dans le sang maternel et produisent des enzymes de cellules endothéliales comme l'Oxyde Nitrique Synthase ou les endothélines. Ces cellules sont directement impliquées dans l'homéostasie de l'espace intervilloux.

Dans la voie d'invasion extra-villeuse, des cytotrophoblastes traversent le feuillet du syncytiotrophoblaste, dès 13 à 14 jours de grossesse, et forment des colonnes continues de cellules isolant l'espace intravilleux de l'endomètre maternel (**Figure 5.4**).

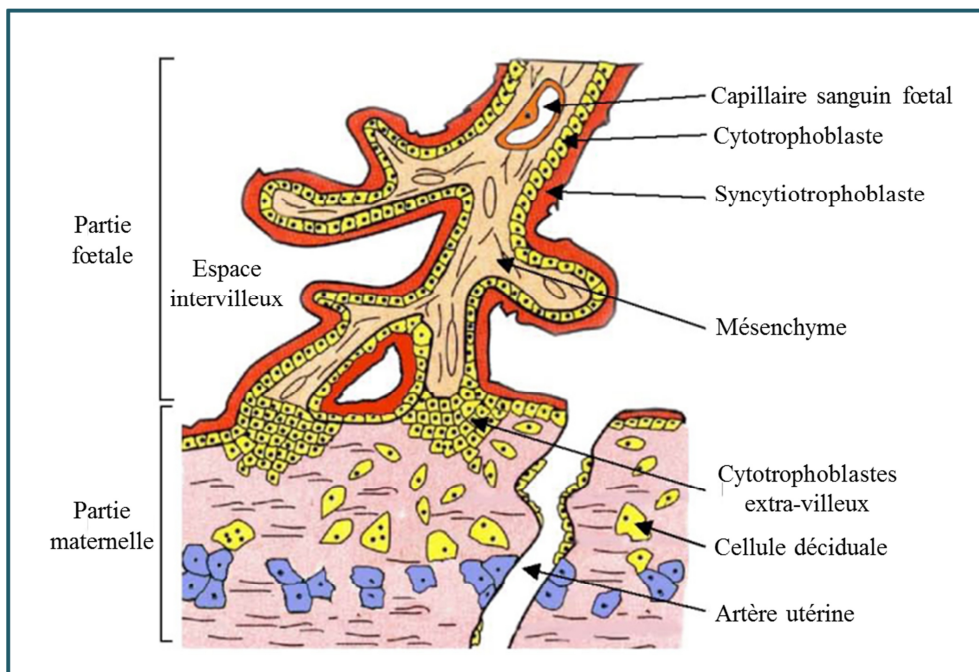


Figure 5.4 : Représentation schématique de villosités chorioniques humaines pour un fœtus âgé de 12 semaines. Les trophoblastes extravilloux s'organisent en colonnes de cellules continues, qui isolent l'espace intravilloux, contenant les capillaires fœtaux des cellules de la paroi utérine. Les trophoblastes envahissent la décidue et se transforment en cellules géantes plurinucléées ou remodelent les artères utérines. Le syncytiotrophoblaste est la première barrière séparant le sang maternel arrivant dans l'espace intervilloux du sang fœtal circulant dans les capillaires fœtaux présents dans le mésenchyme intravilloux. D'après (André Malassiné, Frendo, et Evain-Brion 2010)

Au cours du premier trimestre de gestation, les cellules cytotrophoblastiques extravillieuses infiltrent progressivement la caduque utérine sous-jacente puis migrent préférentiellement en direction des artères spiralées maternelles. Les trophoblastes entraînent des remaniements profonds de la physiologie de ces artères. Ainsi, seules les artères entourées de trophoblastes interstitiels montrent d'importantes altérations de leurs structures. Celles-ci se caractérisent par un oedème, une disparition de l'endothélium et la destruction de la tunique musculaire et des lames élastiques internes, remplacées par un matériel fibreux et fibrinoïde. Ces remaniements structuraux entraînent une perte du contrôle de ces artères par le système

neurovasculaire et par les voies de médiateurs locaux du tonus vasculaire (prostaglandines, endothélines, NO, ...) de l'organisme maternel. Ces adaptations physiologiques assurent une augmentation importante du débit sanguin en direction du placenta. Toutefois dès la 8^{ème} semaine de gestation, les trophoblastes interstitiels ont colonisé la totalité de la muqueuse utérine et atteignent le premier tiers du myomètre. A ce niveau, les trophoblastes se différencient en cellules plurinucléées connues sous le nom de cellules géantes du placenta (**Figure 5.4**) et correspondant à la forme de différenciation terminale de la voie extravilleuse. La colonisation du myomètre engendre un remaniement similaire des artères spiralées au niveau de leurs segments intramyométriaux.

D. Le syncytiotrophoblaste

Dans les échanges materno-fœtal, le sang maternel n'entre jamais en contact avec le sang fœtal. Comme vu précédemment, durant la placentation la circulation sanguine de l'endomètre maternel et une partie de la circulation sanguine dans le myomètre sont détournés vers le placenta. Pour un placenta mature, le sang maternel arrive dans les artères spiralées modifiées et se déverse, par projection saccadée, dans l'espace intervilloux. La chambre intervillouse et les villosités chorioniques contenant le réseau de capillaires fœtaux sont entièrement recouvertes d'une couche de syncytiotrophoblastes (**Figure 5.5**).

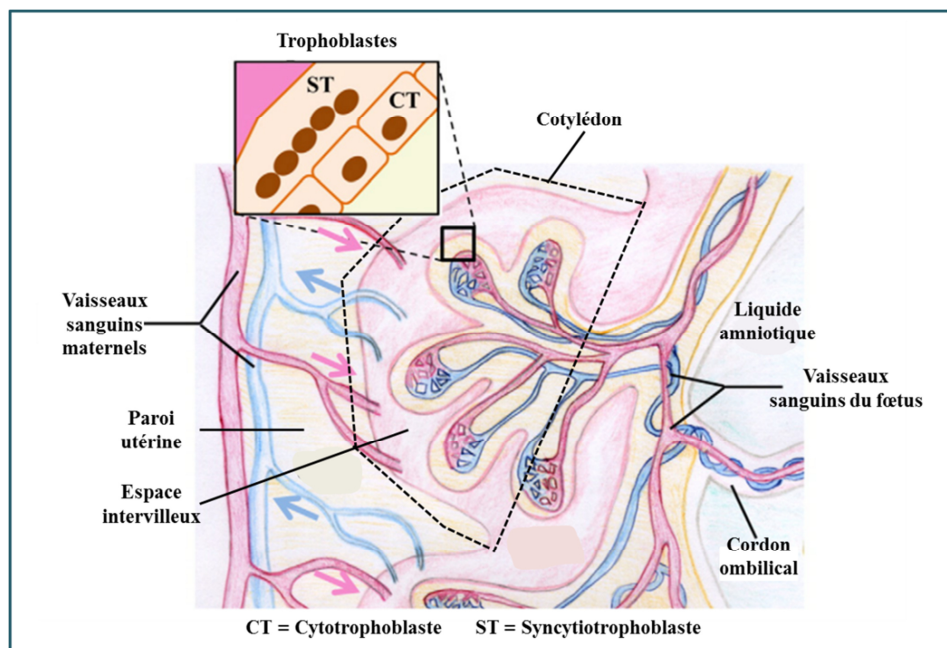


Figure 5.5 : Représentation schématique de la communication sanguine entre le sang maternel et le sang fœtal et localisation des trophoblastes. Les vaisseaux sanguins maternels et fœtaux ne sont pas directement en contact. Le sang maternel diffuse dans la chambre intervillouse (ou espace intervilloux) et doit traverser une fine membrane appelée membrane microvillositaire. Un cotylédon comprend un groupe de villosités émergeant d'une même extension de vaisseaux sanguins. Le trophoblaste est la première barrière séparant le sang maternel du sang fœtal. Il est constitué de deux couches cellulaires appelées syncytiotrophoblastes (ST) et cytotrophoblastes (CT). Les ST forment la couche la plus externe, en contact direct avec le sang maternel. Figure adaptée de (Carmeille et al. 2015).

Les syncytiotrophoblastes sont donc directement en contact avec le sang maternel et l'empêchent d'entrer en contact avec les capillaires sanguins fœtaux présents dans les villosités chorioniques (**Figure 5.5**).

Les syncytiotrophoblastes ont un rôle essentiel dans le fonctionnement du placenta, pour la croissance et le développement embryonnaire par la production des hormones placentaires. Comme ils sont directement en contact avec le sang maternel, ils assurent aussi le rôle de filtre pour les échanges gazeux, ioniques et les échanges en nutriments par la présence à leur surface apicale de microvillosités.

Les syncytiotrophoblastes sont des cellules quiescentes qui sont renouvelées par la fusion des cytotrophoblastes sous-jacents. Dans des pathologies fréquentes de la grossesse comme la pré-éclampsie (5% des grossesses), il a été observé une diminution de la capacité des cytotrophoblastes à fusionner (Langbein et al. 2008) et une émission très importante, par les syncytiotrophoblastes, de particules membranaires dans le sang maternel (Knight et al. 1998), (Johansen et al. 1999). Cette émission de matériel syncytiotrophoblastique entraîne une réponse inflammatoire des cellules endothéliales maternelles et des leucocytes circulants, qui constitue un facteur physiopathologique de la pré-éclampsie (Redman et Sargent 2000). Le dysfonctionnement du syncytiotrophoblaste est donc la cause principale du développement de cette pathologie. L'émission de particules membranaires en grande quantité dans le sang maternel pourrait provenir d'une plus grande susceptibilité de leur membrane plasmique apicale aux contraintes hémodynamiques. Nous nous sommes donc orientés vers l'étude de la réparation membranaire des cellules trophoblastiques.

Objectifs :

Les objectifs de ce travail peuvent se résumer en trois questions majeures :

- 1) Le rôle joué par l'AnxA5 dans la réparation membranaire, mis en évidence au niveau des cellules périvasculaires murines, s'étend-il à d'autres systèmes cellulaires ?
- 2) Quel est le mode d'action de l'AnxA5 dans la réparation membranaire ?
- 3) Quel(s) est (sont) le(s) mécanisme(s) de réparation membranaire des fibres musculaires et des trophoblastes humains ?

Une altération du processus de réparation membranaire conduit au développement de certaines dystrophies musculaires, telle que la LGMD2B (Bansal et al. 2003). Le choix d'un des modèles d'étude s'est donc naturellement porté vers le tissu musculaire strié squelettique. Nous avons étudié trois lignées cellulaires : une lignée provenant d'un patient sain, une lignée provenant d'une patiente atteinte de LGMD2B et une lignée provenant d'un patient atteint de LGMD1C.

Peu de données étant disponibles sur ces lignées, nous avons tout d'abord réalisé un travail de caractérisation. Nous avons ensuite analysé leur capacité à réparer des dommages mécaniques et des dommages créés par insertion de PFTs. Nous avons enfin étudié le comportement de l'AnxA5 dans ces cellules durant la lésion du sarcolemme.

Nous avons réalisé en parallèle une étude sur des trophoblastes humains. Ce choix se justifiait par le fait que le placenta est un des organes les plus riches en AnxA5. D'autre part, les cellules trophoblastiques, qui sont présentes à la surface du placenta, subissent des contraintes mécaniques importantes exercées par le flux sanguin maternel. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe dirigée par Danièle Evain-Brion (INSERM U1139, Université Paris Descartes). Cette étude a été réalisée sur la lignée trophoblastique BeWo et sur des trophoblastes primaires humains. Elle a conduit à deux publications qui sont présentées.

Matériel et méthodes

A. Culture cellulaire :

A1. Modèles cellulaires

Pour mener à bien ce projet de recherche nous avons utilisé 3 lignées de cellules musculaires striées squelettiques humaines.

-La lignée **LHCN-M2** est une lignée de myoblastes dérivés de cellules satellites extraites d'un muscle grand pectoral d'un homme blanc âgé de 41ans et donneur d'organe (cœur). Le terme LHCN est un acronyme signifiant: Lox-Hygro-hTERT et Cdk4-Neo, qui sont les deux constructions plasmidiques utilisées (Zhu et al. 2007) pour immortaliser les myoblastes dérivés des cellules satellites prélevées. Le terme M2 désigne un sous-clone très bien différencié de myoblastes LHCN. La lignée LHCN-M2 présente les avantages de se différencier rapidement ainsi que d'exprimer les protéines caractéristiques du muscle strié squelettique (chaines lourdes de myosine par exemple) après différenciation et fusion. La lignée LHCN-M2 a été notre lignée référence de tissu musculaire strié squelettique sain.

-La lignée **578** est une lignée (Philippi et al. 2012) qui a été élaborée à partir de myoblastes extraits par biopsie d'un triceps d'une femme âgée de 25ans atteinte de LGMD2B. La patiente a été diagnostiquée comme porteuse d'une mutation ponctuelle pour les 2 allèles du gène codant la dysferline dans un site d'épissage. Cette mutation a pour conséquence une absence complète de l'expression de la dysferline que ce soit dans les myoblastes et myotubes des cultures primaires parentales ou de la lignée immortalisée (Philippi et al. 2012). Malgré cette absence de dysferline et à l'instar de la lignée LHCN-M2, l'expression de protéines marqueurs de la myogenèse comme la chaîne lourde de myosine, la desmine ou encore la caveoline-3 n'est pas affectée.

-La lignée **650** a été générée à partir de myoblastes extraits du muscle vaste latéral d'un homme âgé de 44ans et atteint de LGMD1C. Ce patient a été caractérisé comme porteur d'une mutation faux sens pour un allèle du gène codant la cavéoline-3. Cette mutation a pour conséquence une diminution significative de l'expression de caveoline-3 (Timmel et al. 2015).

Les lignées 650 et 578 ont été établies selon le même protocole que pour la lignée LHCN-M2. L'ensemble des lignées nous a été fournie par la plateforme d'immortalisation des myoblastes humains de l'Institut de Myologie de Paris (UM76, Université Paris 6, France).

L'ensemble des informations principales sur les lignées utilisées sont résumées dans le **Tableau A**.

Matériel et méthodes

Nom de la lignée	LHCN-M2	578	650
Laboratoire(s) ayant généré(s) la souche	Chun-Hong Zu / Vincent Mouly	Ute Zacharias / Susanne Philippi Anne Bigot / Vincent Mouly	Equipe de Simone Spuler
Année	2007	2012	2012
Tissu d'origine	Grand pectoral	Triceps	Vaste latéral
Sexe du patient	homme	femme	homme
Age du patient	41 ans	25 ans	44 ans
Pathologie du patient	Aucune	LGMD2B	LGMD1C
Mutation	Aucune	c.2810+2T>A (en 5' de l'intron 26) homozygote	c.80 G>A (dans l'exon 1) hétérozygote
Effet de la mutation	Aucune	Altération d'un site d'épissage alternatif	Modification de la séquence protéique : p.R27>Q
Conséquence de la mutation	Aucune	Absence de dysferline	Diminution de l'expression de la caveoline-3/séquestration dans l'appareil de Golgi

Tableau A: Récapitulatif des principales informations sur les lignées utilisées.

A2. Supports de culture

Plusieurs supports de culture ont été utilisés durant ce travail de thèse. Ces supports ont été choisis selon nos besoins (nombre de cellules, support adapté à la microscopie, etc). Quelques informations les concernant sont résumées dans le **Tableau B**.

Les supports que nous avons le plus utilisés pour l'observation sont :

- **Les chambres de culture sur lame à 8 puits (Lab-Tek™ II)** sont des supports de culture développés spécialement pour la microscopie de fluorescence. Il s'agit d'une lame de borosilicate rectangulaire compartimentée par du polystyrène en 8 chambres de 0,7cm² de surface chacune. La lame de borosilicate est traitée pour la culture cellulaire et son épaisseur comprise entre 0,16mm et 0,19mm (coverslip 1,5) minimise la dispersion des rayonnements en microscopie inversée.
- **Les boîtes de pétri avec en leur centre une lamelle de borosilicate quadrillée et numérotée (MatTek Glass Bottom Culture Dishes)** sont des supports circulaires en polystyrène de 35mm de diamètre avec en leur centre un disque en borosilicate de 14 mm de diamètre et d'épaisseur comprise entre 0,19mm et 0,23mm. La particularité de ces supports développés pour la microscopie à fluorescence est qu'une grille, dont les cases comportent un code alphanumérique, a été gravée sur le disque central par le fabricant (MatTek corporation, USA).
- Pour simplifier l'écriture de cette section « matériel et méthodes », ces supports sont référencés comme Lab-Tek et MatTek.

Matériel et méthodes

Nom	Flacon de culture en polystyrène 25cm ²	Flacon de culture en polystyrène 75cm ²	Plaque de culture multipuits	Chambre de culture sur lame à 8 puits	boîtes de pétri fonds en borosilicate quadrillé et numéroté
Nom du produit	Flask T25	Flask T75	Plaque 6 puits	LabTek II 8 puits	P35G-2-14-C-GRID
Fabricant	Falcon® BD Bioscience	Falcon® BD Bioscience	Falcon® BD Bioscience	Nunc™ ThermoScientific	MatTek®
Matériaux	Polystyrène	Polystyrène	Polystyrène	Bords et couvercle en polystyrène fond en borosilicate	Bords et couvercle en polystyrène disque central du fonds en borosilicate
Particularités	Polystyrène traité au plasma : bonne adhésion des cellules + bouchon ventilé avec une membrane de 0,2µm	Polystyrène traité au plasma : bonne adhésion des cellules + bouchon ventilé avec une membrane de 0,2µm	Polystyrène traité au plasma : bonne adhésion des cellules	Le fond du support est une lame de verre très fine (0,16-0,19 mm) adapté à la microscopie à haute résolution (pas d'auto fluorescence)	Le disque central est une lame de verre très fine (0,19-0,25 mm) dans laquelle est gravée une grille avec des cases contenant un code alphanumérique
Surface de culture	25 cm ²	75 cm ²	9,6 cm ² par puits	0,7 cm ² par puits	9,6 cm ² (disque central 1,5 cm ²)
Contexte expérimental d'utilisation	Culture + Préparation d'extraits protéiques	Culture + Amplification + Préparation d'extraits protéiques	Préparation d'extraits protéiques + test de contractilité	Immuno fluorescence ; réparation membranaire	Immuno fluorescence cellules endommagées
Nombre de cellules estimées pour 60% de confluence	1,8 millions de cellules	5,4 millions de cellules	700 000 cellules	50 000 cellules	700 000 cellules
Nombre de cellules estimées pour 80% de confluence	2,4 millions de cellules environ	7,2 millions de cellules environ	940 000 cellules environ	70 000 cellules environ	940 000 cellules environ

Tableau B : Tableau récapitulatif des caractéristiques des différents supports utilisés en culture cellulaire

A3. Milieux de culture

a-Prolifération cellulaire

Selon les recommandations de l'Institut de Myologie de Paris, nous cultivons les myoblastes LHCN-M2 dans un milieu non commercial appelé KMEM. Le milieu KMEM est un milieu appelé milieu X supplémenté d'un mélange d'additifs. Pour faire 500ml de milieu X, il faut

mélanger 1 volume (80ml) de milieu 199 + Glutamax™ (Gibco® by life technologies) avec 4 volumes (320ml) de DMEM high glucose + Glutamax™ sans pyruvate (Gibco® by Life technologies) et ramener le tout à 20% de Sérum de Veau Fœtal décomplémenté (Gibco® by life technologies (100ml)). Pour faire 500ml de KMEM, nous ajoutons au milieu X, un mélange d'additifs commercialisé par Promocell sous le nom de Skeletal Muscle Cell Growth Medium SupplementMix (C-39365). L'équipe qui nous a fourni les lignées cellulaires, nous a recommandé d'utiliser chacun des additifs à des concentrations moitié moins importantes que celles recommandées par le fabricant. Nous avons alors testé des concentrations encore plus basses, en vérifiant qu'elles n'affectaient ni la cinétique de croissance des myoblastes, ni la localisation de l'AnxA5. La nature des additifs et les concentrations retenues sont les suivantes :

De la **fétuine bovine** (concentration finale : **12,5µg/ml**) : la fétuine est une glycoprotéine faisant partie de la famille des fétuines. Ces protéines dont la plus connue est l'albumine sont fabriquées par les hépatocytes et libérées dans le sang où elles servent de protéine-cargo pour de nombreuses substances contenues dans le sang.

Du « **basic Fibroblast Growth Factor** », **recombinant humain** (bFGF, concentration finale : **0.25ng/ml**) le bFGF est un membre de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes. Le facteur de croissance basique des fibroblastes est un facteur mitogénique des myoblastes.

De l'« **Epidermal Growth Factor** », **recombinant humain** (EGF, concentration finale : **2,5ng/ml**) : le facteur de croissance épidermique est un facteur de croissance faisant partie d'une famille d'une douzaine de facteurs de croissance impliqués dans le développement et le fonctionnement normal de la plupart des tissus.

De l'**Insuline recombinante humaine** (concentration finale : **2,5µg/ml**). L'insuline est une hormone peptidique hypoglycémisante produite par les cellules β pancréatiques des îlots de Langerhans. Dans des conditions physiologiques son action hypoglycémisante se fait via son interaction avec le récepteur à l'insuline (I-R) à la membrane des cellules cibles. Utilisée à une très forte concentration ou sur des cellules n'exprimant pas le récepteur à l'insuline, elle peut agir sur d'autres récepteurs, comme l'IGF-R (pour « Insulin-like Growth Factor-1 Receptor ») (Lamothe et al. 1998). Dans ces conditions l'insuline agit comme un facteur de croissance et possède des propriétés mitogénique et anti-apoptotique.

Pour cette raison, en culture cellulaire, l'insuline recombinante est utilisée à des concentrations beaucoup plus importantes que la concentration physiologique (40pM et 110pM).

De la **dexaméthasone** (concentration finale : **0,1µg/ml**) La dexaméthasone est une hormone glucocorticoïde de synthèse faisant partie de la liste des médicaments essentiels selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Son action sur la croissance musculaire est mal documentée.

Par précaution les lignées issues de cellules pathologiques ont été cultivées dans un milieu similaire, mais contenant des concentrations en additifs deux fois plus importantes. Pour prévenir de toute contamination bactérienne nous ajoutons à ces milieux de culture une solution de **gentamicine** (Gibco® by Life Technologies) à une concentration finale de **50µg/ml**.

b-Différenciation cellulaire

Dans le cas d'une mise en différenciation des cellules, les myoblastes en culture, à au moins 80% de confluence, ont été placés dans un milieu de différenciation. Ce milieu, sans antibiotique, est composé par du milieu X supplémenté d'une solution d'**insuline humaine recombinante** (Sigma-Aldrich) à une concentration finale de **10µg/ml**. Dans ces conditions de culture le stress métabolique généré par l'absence de sérum et de facteurs de croissance entraîne une différenciation des myoblastes en myocytes durant les premières 48h (J2) à puis une fusion des myocytes pour former des myotubes multinucléés à partir de 72h après incubation (J3).

A4. Entretien des cellules en culture

En stock, selon nos besoins, les cellules prolifèrent sur un support en polystyrène de 25cm² de surface de culture, traité pour la culture cellulaire (Flask T25, Falcon®) ou de 75cm² (T75, Falcon®) (**Tableau B**). Les bouchons des flasks possèdent à leur centre une membrane hydrophobe en forme de disque filtrant l'air à 0,22µm, pour être en conditions optimales d'échanges gazeux entre les cellules et l'air environnant tout en préservant la stérilité des cultures. Une fois ensemencées les cellules ont été placées dans un incubateur réglé pour maintenir l'air à 37°C avec une humidité élevée et enrichie en CO₂ (5%). Les milieux de culture ont été changés tous les 3 jours et/ou 24h avant une expérience.

Lorsque les cellules ont atteint une confluence de l'ordre de 80% elles ont été mises en différenciation ou ont été décollées des supports de culture pour un stockage en cryothèque (cryoconservation) ou enfin pour un réensemencement (entretien en culture).

a-Réensemencement

Les cellules ont été, au préalable, décollées de leur support de culture. Pour ce, elles ont d'abord été lavées 1 fois avec du DPBS sans calcium et sans magnésium (DPBS-/-) (KCl 2,67mM ; KH_2PO_4 1,47mM ; NaCl 137,93mM ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,06mM ; Gibco® ; 10ml pour une T25 et 20ml pour une T75) avant ajout de 1ml (3ml pour une T75) d'une solution de trypsine-EDTA 0,05% (Gibco®) pendant 5min à 37°C. Après incubation, les cellules en suspension ont été récupérées avec 5ml de DMEM sans pyruvate à 20% SVF (10ml pour une T75) et transférées dans un tube Falcon® 15ml. Elles ont ensuite été centrifugées (Eppendorf Centrifuge 5804R) à 200g pendant 5min afin de séparer les cellules du surnageant contenant la trypsine-EDTA. Le surnageant a été éliminé par aspiration et le culot cellulaire a été repris dans 1 ml de milieu de culture approprié.

Pour le comptage en cellule de Toma, 10µl de cette suspension cellulaire de concentration inconnue ont été prélevés et mélangés à 50µl de bleu trypan (Sigma-Aldrich) 0,04% et 40µl de DMEM sans pyruvate 20% SVF. 10µl de ce mélange ont été prélevés et placés sur une cellule de Toma pour numération. Une fois la concentration en cellules évaluée les volumes adéquats de suspension cellulaire à réensemencer ou à congeler ont été calculés. Généralement 2×10^5 cellules ont été placées en T25 pour maintenir les lignées en culture.

Les myotubes sont des cellules post-mitotiques (quiescentes), il n'est pas possible de les entretenir en culture.

b-Cryoconservation

Après le traitement à la trypsine et le comptage en cellule de Toma, 5×10^5 à 1×10^6 cellules ont été placés dans un volume final de 1mL, de milieu de cryoconservation (90% milieu de culture, 10% DMSO) pour stockage. Pour la cryoconservation, les cellules ont dans un premier temps été placées 24h à -80°C, dans une boîte de congélation dont les parois sont remplies d'isopropanol. Après 24h, les cellules ont été placées dans une cryothèque contenant de l'azote liquide.

B. Microscopie :

B1. Microscopie à transmission et épifluorescence

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope inversé Olympus IX81 équipé d'un boîtier de contrôle IX2-UCB, d'un système de fluorescence X-Cite® 120 PC et d'une caméra Olympus XM10. Les images ont été générées avec le logiciel Olympus Cellsens®.

a-Microscopie photonique à transmission et DIC

Le microscope Olympus IX81 est équipé pour des observations en transmission « classique » et en DIC (pour « differential interference contrast »). L'observation en DIC est réalisée grâce à la présence d'un filtre polarisant, au niveau du diaphragme, et de deux filtres de Wollaston. Deux objectifs sont équipés pour l'observation en DIC, un objectif à air x20 et un objectif à immersion à huile x60. Un alignement de Khöler a systématiquement été réalisé pour les observations en transmission ou en DIC.

b-Microscopie photonique à épifluorescence

Les différents fluorochromes utilisés (marqueurs fluorescents et/ou fluorochromes conjugués aux anticorps) ont pu être mis en évidence grâce aux 3 cubes de fluorescence dont est équipé le microscope Olympus IX81. Ces filtres sont les suivants :

-Pour l'observation dans le bleu (exemple DAPI) : **Cube U-MWU2** composé d'un filtre d'excitation de type passe-bande 330-385nm ; d'un miroir dichroïque 400nm (réfléchissant pour toutes les longueurs d'ondes inférieures à 400nm et transparent pour toutes les longueurs d'ondes supérieures à 400nm) et d'un filtre d'émission de type passe-haut 420nm (laissant passer toutes les longueurs d'ondes supérieures à 420nm)

-Pour l'observation dans le vert (exemple Alexa 488) : **Cube U-MINIBA2** composé d'un filtre d'excitation de type passe-bande 470-490nm ; d'un miroir dichroïque 505nm et d'un filtre d'émission de type passe-bande 510-550nm.

-Pour l'observation dans le rouge (exemple Alexa 546) : **Cube U-MWG2** composé d'un filtre de type passe-bande 510-550nm ; d'un filtre d'émission de type passe-haut 590nm et d'un miroir dichroïque 570nm.

B2. Microscopie confocale

Lors des expériences d'irradiation, les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope confocal bi-photon à balayage (TCS SP2 AOBS, Leica). Nous avons utilisé 2 objectifs durant nos expériences : 1 objectif 10X (HC PL APO CS, 10,0X 0,40) à immersion et 1 objectif 63X à immersion (HCX PL APO CS, 63,0X 1,40). Les cellules ont été irradiées à l'aide d'un laser proche-infrarouge pulsé, associé au microscope, le dispositif est décrit dans le **chapitre D, paragraphe D1C**, consacré aux ruptures mécaniques et réparation membranaire.

Les tests de réparation membranaire ont été réalisés uniquement à l'aide de l'objectif 63X à immersion et l'observation du signal de fluorescence du FM1-43 a été possible par l'excitation du fluorochrome avec un laser Argon 488nm (intensité paramétrée à 40% de l'intensité maximale). L'émission de fluorescence a été mesurée sur une fenêtre allant de 520nm à 650nm.

C. Western Blot :

C1. Préparation des extraits protéiques totaux

Les myoblastes à une confluence maximale de 60% environ ou les myotubes cultivés en T25 ont été décollés de leur support comme décrit précédemment dans le **chapitre A, paragraphe A4**. Après centrifugation à 200g pendant 5min et élimination du surnageant le culot cellulaire a été repris dans 10ml de DPBS avec calcium et avec magnésium (DPBS+/+) (0,9mM CaCl_2 (anhydre), 0,49mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,67mM KCl, 1,47mM KH_2PO_4 , 137,93mM NaCl, 8,06mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et centrifugé à nouveau à 200g durant 5min. Le surnageant a été éliminé par aspiration et le culot cellulaire a été repris dans 1ml de DPBS+/+ et transféré dans un tube eppendorf 1,5ml pour un nouveau cycle de centrifugation à 200g durant 5min (Eppendorf centrifuge 5415D). Le surnageant a été éliminé délicatement par aspiration et le culot repris dans 150 μl de DPBS-/- supplémenté de 1mM EGTA. Les extraits protéiques ont été obtenus par traitement de la suspension cellulaire à l'aide d'un sonicateur Branson digital sonifier (amplitude 10%, durée de 2min avec des impulsions de 5s et intervalles de 5s) dans de la glace. Après sonication la suspension a été centrifugée 2 fois à 13 000g pendant 1min afin d'éliminer les débris cellulaires. Les extraits protéiques obtenus ont été stockés à -80°C jusqu'à analyse.

C2. Dosage des extraits protéiques

La concentration massique des extraits protéiques a été mesurée en plaque 96 puits à fonds plat (IMMULON™ Thermo Scientific) selon la méthode de Bradford (Bradford 1976) à l'aide du réactif Quick start™ bradford 1X dye reagent (Biorad). Pour ce, des duplicats de 2 et 3 μl de l'échantillon brut ont été mélangés à 98 μl et 97 μl respectivement du Bradford 1X dye reagent et l'absorbance du mélange a été mesurée à 595nm à l'aide d'un lecteur de plaque DYNEX Triad LT. La concentration en protéines est déterminée grâce à une gamme étalon de 2 à 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à partir d'une solution d'AnxA5 pure à 1mg/ml utilisée comme protéine de référence.

C3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation des protéines des extraits totaux cellulaires a été réalisée en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (Laemmli 1970). 10 μg d'extraits protéiques totaux ont été préparés dans du tampon de charge (concentrations finales : 10% glycerol ; 2% SDS ; 0,05% bleu de bromophénol ; 50mM Tris-HCl; 0,29M β -mercapto-éthanol ; pH 6,8), déposés sur un gel à 10% de polyacrylamide, 0,1% SDS et laissé migrer sous un courant électrique d'intensité constante de 30mA, dans un tampon de migration (25mM Trizma®Base / Sigma-Aldrich ; 200mM glycine ; 1% SDS) pendant 1h environ.

Le marqueur de masse moléculaire Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Biorad) a été utilisé pour évaluer les masses moléculaires apparentes des protéines d'intérêt.

C4. Transfert des protéines

Les protéines séparées par électrophorèse ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Immun-Blot® Biorad). La membrane de PVDF a été préalablement hydratée par un lavage durant 5min à température ambiante dans du méthanol, suivi d'un lavage durant 1min à température ambiante dans de l'eau déminéralisée. Le gel et la membrane de PVDF hydratée ont été mis en contact dans un montage semi-sec de type sandwich entre 2 couches composées par une couche de papier absorbant « extra thick blot paper » (Biorad) et une couche de compresse fibreuse (**Figure 1**). A l'aide d'une pipette, les bulles d'air entre le gel et la membrane de PVDF ont été éliminées. L'ensemble a été trempé dans du tampon de transfert (20% éthanol ; 25mM Trizma®Base / Sigma-Aldrich ; 200mM glycine ; 1% SDS) et placé entre 2 électrodes sous une tension électrique de 100volts pendant 1h.

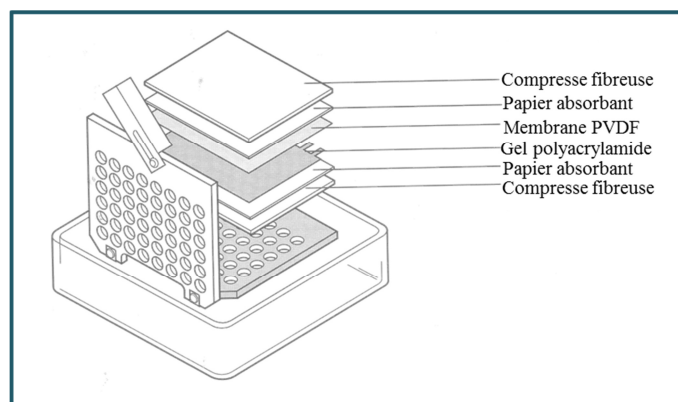


Figure 1 : Représentation schématique du montage nécessaire pour le transfert des protéines du gel vers la membrane de PVDF dans nos conditions expérimentales. Après l'étape de migration des protéines, le gel de polyacrylamide a été mis en contact direct avec une membrane en PVDF dans un montage en sandwich avec une couche de papier absorbant et une couche de compresse fibreuse. Le montage a été humidifié avec du tampon de transfert et comprimé entre 2 plaques en plastique.

C5. Détection immunologique des protéines d'intérêt

Une fois le transfert des protéines sur membrane de PVDF terminé cette dernière a été rincée rapidement avec de l'eau distillée. Le succès du transfert a été systématiquement vérifié par la présence sur la membrane du marqueur de masse moléculaire coloré Precision Plus Protein™. Après rinçage la membrane a été saturée pendant 2h à T°C ambiante sous agitation dans du tampon TBS-T/lait (10mM Trizma®Base ; 150mM NaCl ; 0,1% Tween20 ; 5% lait écrémé ; pH 8).

Matériel et méthodes

Anticorps Primaires utilisés							
Cible	Antigène ciblé	Espèce de provenance	Type	Clone	Fournisseur	Contexte technique	Dilution
Actinine- α	Actinine- α purifiée de rat	Souris	IgG monoclonal	EA-53	Sigma-Aldrich	Immuno-cytofluorescence	1/500 (2,5 μ g/ml 1 IgG)
Actine	Actine F des tissus musculaires et foie humain	<i>Amanita Phalloïdes</i>	Toxine fongique Phalloïdine-TRITC		Sigma-Aldrich	Immuno-cytofluorescence	1/500 (200ng/ml)
AnxA5	Annexine A5 humaine totale	Souris	IgG monoclonal	AN5	Sigma-Aldrich	Immuno-cytofluorescence Western Blot	1/600 (3,33 μ g/ml) 1/1250 (1,6 μ g/ml)
Caveoline-3	Partie Nter de la protéine murine (3-40aa)	Souris	IgG monoclonal	C-2	Santa Cruz Biotechnology	Immuno-cytofluorescence Western Blot	1/200 (1 μ g/ml) A compléter
Dysferline	Peptide synthétique contenant la séquence (1999-2106aa) de la protéine humaine	Souris	IgG monoclonal	Ham1/7B6	Novocastra™	Immuno-cytofluorescence Western Blot	1/100 (1,8 μ g/ml) 1/250 (0,72 μ g/ml)
GAPDH	GAPDH humaine complète (1-335 aa)	Lapin	IgG polyclonal		Santa Cruz Biotechnology	Western Blot	1/1000 (0,2 μ g/ml)
Lamp-1/CD107a	Cellules spléniques adhérentes humaines	Souris	monoclonal	H4A3	Santa Cruz Biotechnology	Immuno-cytofluorescence	1/200 (1 μ g/ml)
Anticorps Secondaires utilisés							
Cible	Antigène ciblé	Espèce de provenance	Type	Clone	Fournisseur	Contexte technique	Dilution
IgG de souris	IgG totales de souris	Mouton	Polyclonal conjugué à la HRP		Amersham™	Western Blot	1/2000
IgG de lapin	IgG totales de lapin	Gorille	Polyclonal conjugué à la HRP		Amersham™	Western Blot	1/2000
IgG de souris	IgG totales de souris	Chèvre	Polyclonal conjugué à l'Alexa-488		Life Technologies	Immuno-cytofluorescence	1/1000
IgG de souris	IgG totales de souris	Chèvre	Polyclonal Alexa-488 Billes d'or 1,4nm		Nanoprobes	Microscopie corrélative	1/100

Tableau C : Tableau résumant les données principales concernant les protéines marquées durant les expériences de Western blot et d'immunocytofluorescence. A noter que la ligne correspondant à l'actine est de couleur différente car nous avons utilisé une toxine conjuguée à un fluorochrome et non un anticorps.

L'anticorps primaire a ensuite été incubé avec la membrane sur la nuit à 4°C sous agitation lente, aux dilutions indiquées dans le **Tableau B**, dans du tampon TBS-T/lait. Après incubation la membrane a été lavée 5 fois 10min à température ambiante sous agitation dans du tampon TBS-T/lait. L'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase) a été ensuite incubé avec la membrane dans du tampon TBS-T/lait pendant 2h à température ambiante, sous agitation lente et aux dilutions indiquées dans le **Tableau B**. Avant l'étape

finale de révélation la membrane a été lavée 5 fois 10min à température ambiante sous agitation dans du tampon TBS-T/lait. La révélation a été faite par colorimétrie à l'aide du kit Opti-4CN™ substrate kit (Biorad) sous agitation à température ambiante. L'arrêt de la réaction a été réalisé avec de l'eau déminéralisée. L'intensité des bandes a été analysée à l'aide du logiciel ImageJ Macbiophotonic

C6. Témoin de charge pour le western blot

La Glycéraldéhyde 3-Phosphate DésHydrogénase (GAPDH) a été utilisée comme témoin de charge. La GAPDH est présente dans le cytosol, le noyau, les zones périnucléaires et les membranes. Des études montrent que son taux d'expression peut changer selon le type de tissu et que l'hypoxie est un facteur influençant également ce taux d'expression (Barber et al. 2005) (Yamaji et al. 2003). Il est donc déconseillé de l'utiliser comme contrôle interne pour des études comparatives d'une protéine entre des tissus différents ou dans des phénomènes associés à l'hypoxie, ce qui n'est pas notre cas.

D. Rupture/perforation de la membrane plasmique *in vitro* et réparation membranaire :

D1. Témoin de rupture et réparation membranaire

Pour tester la capacité des cellules à réparer des lésions de la membrane plasmique nous avons utilisé la sonde fluorescente FM1-43. Le FM1-43 (*N*-(3-Triéthylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium Dibromide) est une sonde fluorescente appartenant à la famille des sondes amphiphiles styrylées (**Figure 2**).

Ces sondes sont composées d'une partie terminale appelée queue qui consiste généralement en 2 groupements aliphatiques liés au reste de la molécule par un groupement amine tertiaire.

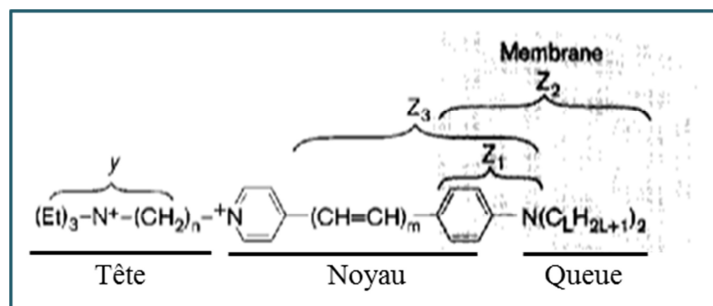


Figure 2 : Structure générale des sondes styrylées. Les sondes appartenant à cette famille sont composées d'une queue hydrophobe leur permettant de s'insérer dans les bicouches lipidiques, d'une partie appelée noyau responsable de leurs propriétés de fluorescence et d'une tête polaire qui bloque le passage à travers les bicouches lipidiques après insertion. Inspirée de l'article : (W. J. Betz, Mao, et Smith 1996).

La queue hautement hydrophobe permet à la sonde de s'insérer rapidement dans un feuillet de la bicouche lipidique. La partie centrale de ces sondes, appelée noyau, est composée de 2 cycles aromatiques séparés par un nombre de doubles liaisons carbone-carbone variable. Cette partie est responsable de la fluorescence de la sonde et les spectres d'excitation-émission sont influencés par le nombre de doubles liaisons entre les cycles aromatiques. Plus il y a de doubles liaisons entre les cycles et plus les spectres d'excitation-émission ont des longueurs d'ondes importantes. A titre d'exemple, le FM1-43, qui possède une seule double liaison entre les cycles aromatiques, à des maxima d'excitation/émission de 502/625nm tandis que le FM4-64 qui possède trois doubles liaisons à des maxima d'excitation/émission de 560/767nm (**Figure 3A**).

Ces sondes deviennent beaucoup plus fluorescentes dans l'environnement hydrophobe de la membrane plasmique (Bolte et al. 2004). La dernière partie structurale de ces sondes est appelée tête. Elle est responsable de l'incapacité (**Figure 3B**) de la sonde à traverser les bicouches lipidiques. En effet, il s'agit de groupements alkyles reliés par des groupements ammonium quaternaires (charges positives) donnant aux molécules une charge globale positive leur empêchant de traverser l'environnement hydrophobe membranaire.

D2. Cas des ruptures mécaniques induites par irradiation laser

a-Préparation des cellules avant irradiation

Les myoblastes ont été cultivés en Lab-Tek 8puits dans du milieu KMEM complet à une confluence n'excédant pas 60%. Le milieu de culture a été changé la veille de l'expérience.

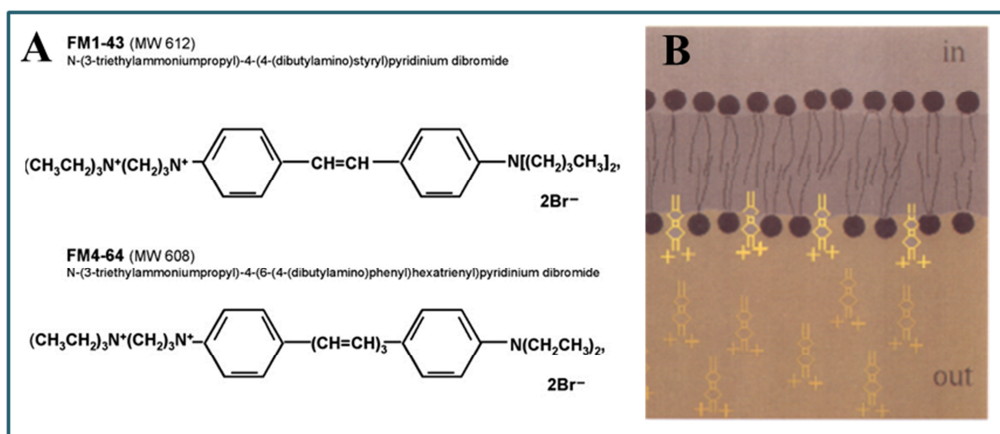


Figure 3 : Représentation schématique de 2 sondes styrylées (A) et représentation schématique de leur insertion dans les bicouches lipidiques.

A Formules semi-développées des sondes FM1-43 et FM4-64. Figure tirée de l'article (Bolte et al. 2004). **B** Représentation schématique du mode d'insertion des sondes amphiphiles styrylées dans les membranes biologiques. Par leur partie apolaire, les sondes s'insèrent un feuillet de la membrane biologique et sous l'influence de l'environnement hydrophobe, elles émettent une fluorescence intense. Figure tirée de l'article (W. J. Betz, Mao, et Bewick 1992)

Les myotubes de J3 à J4 ont été générés dans les conditions décrites en **chapitre A, paragraphe A3**, et cultivés en Lab-Tek 8puits dans du milieu KMEM différenciation. Le milieu de culture a été changé la veille de l'expérience.

b-Rupture membranaire

Les cellules ont été incubées 5min avant l'acquisition dans du DPBS supplémenté de 5µg/ml de FM1-43FX (Invitrogen) et maintenues dans la glace. Pour induire une rupture mécanique de la membrane plasmique des cellules ont été irradiées à température ambiante (20-22°C) avec un laser pulsé Titanium : Sapphire (Chameleon™, Coherent Inc, CA, USA) réglé à 820nm et le modulateur électro-optique (EOM ; LINOS Photonics™) paramétré pour que le laser ait une puissance, avant entrée dans l'objectif (63X, huile) de 110mW +/- 5mW. Une irradiation consiste à balayer une zone d'intérêt (ROI) de 1µm x 1µm à trois reprises. Chaque balayage dure 1.6s. Suite à l'irradiation, 100 images successives de 512x512 pixels avec 1,6s de temps d'acquisition entre les images sont enregistrées par cellule irradiée. L'acquisition, que ce soit pour l'irradiation ou l'enregistrement post-irradiation, se fait avec le trou de détection confocal (pinhole) ouvert à 1 unité d'Airy. Pour chaque condition, 3 expériences indépendantes ont été analysées, avec au moins 5 cellules analysées par expérience. Deux expériences indépendantes sont réalisées à des jours différents, sur des cellules avec un nombre de passages différent (au minimum 2 passages après décongélation et au maximum 30 passages dans l'absolu) et avec des préparations de DPBS/FM1-43 fraîches. La condition standard pour un test de réparation membranaire est réalisée dans du DPBS+/+ supplémenté de 1mM de Chlorure de calcium (CaCl₂). Les expériences contrôles (témoin négatif) sont réalisées en DPBS-/- supplémenté de 1mM EGTA. La rupture de la membrane et le processus de réparation membranaire ont été évalués en mesurant les variations d'intensité de fluorescence intracellulaire du FM1-43. Le FM1-43 a été excité avec un laser Argon 488nm (intensité paramétrée à 40% de l'intensité maximale) et l'émission de fluorescence a été mesurée entre 520nm et 650nm.

Pour l'analyse quantitative, l'intensité de fluorescence globale de la cellule a été mesurée sur toute la durée de l'enregistrement. L'intensité de fluorescence a été corrigée en soustrayant à toutes les images, l'image avant irradiation. Toutes ces opérations ont été faites grâce à l'utilisation du logiciel ImageJ.

D3. Cas des perforations de la membrane plasmique par utilisation de la toxine bactérienne Streptolysine O (SLO)

a-Réparation membranaire

En Lab-Tek 8puits, les myotubes à J3 ont été lavés 1 fois avec une solution froide de DPBS-/- supplémentée de 1mM EGTA, puis 2 fois avec une solution de DPBS+/+ supplémentée de 1mM CaCl₂. Les cellules ont été incubées dans la solution de perméabilisation (DPBS+/+ ; 1mM CaCl₂ ; 10mM DTT ; 20mM D-glucose ; 300ng/ml SLO) pendant 2min à température

ambiante. Elles ont été ensuite rapidement lavées 2 fois avec du DPBS+/+ 1mM CaCl₂ et placées au microscope préréglé pour l'observation de fluorescence dans le vert (25% de l'intensité d'émission maximale de la lampe à vapeur de mercure ; 500ms de temps d'exposition pour la caméra). Un champ au hasard a été sélectionné en microscopie à transmission. L'observation en microscopie de fluorescence a débuté par l'ajout d'une solution de DPBS+/+ 1mM CaCl₂ supplémentée de 5µg/ml de FM1-43. Une image a été enregistrée toutes les 30s pendant 360s. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ Macbiophotonics, de la même façon que pour les expériences d'irradiation laser.

Nous avons systématiquement réalisés deux contrôles. Un contrôle a été réalisé en absence de Ca²⁺, en remplaçant de DPBS+/+ par du DPBS/- dans toutes les étapes. Le second contrôle a consisté à réaliser la même expérience mais en absence de SLO. Les expériences de réparation membranaire ont été réalisées pour les lignées 578, 650 et LHCN-M2. Pour la lignée LHCN-M2, elles ont été réalisées pour des cellules sauvages, déficientes en AnxA5 et également exprimant l'EGFP-AnxA5. L'observation des cellules exprimant l'EGFP-AnxA5 a été réalisée en absence de FM1-43.

b-Localisation des protéines endogènes dans les cellules endommagées

Après traitement à la SLO, les cellules ont directement été fixées en méthanol puis immunomarquées comme décrit dans le **paragraphe E-1**

E. Immunocytofluorescence : Localisation des protéines endogènes dans les cellules intactes et endommagées :

E1. Dans les cellules intactes

Les cellules (myoblastes et myotubes), en Lab-Tek 8 puits, ont été lavées 2 fois en DPBS+/+ puis fixées en méthanol à -20°C pendant 5min. L'excédent de méthanol a été éliminé en réalisant 3 lavages dans du DPBS+/+ puis, les cellules ont été traitées avec du DPBS+/+ 2% d'albumine de sérum de bœuf (BSA) 5 minutes à température ambiante. Les incubations (**Tableau B**) ont été réalisées 1h à température ambiante avec les dilutions appropriées d'anticorps dans du DPBS+/+ supplémenté de 2% BSA. L'excès d'anticorps primaire a été éliminé par 3 lavages successifs avec du DPBS+/+ et les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire approprié au 1/1000^{ième} en DPBS+/+ 2% BSA 1h à température ambiante. Dans la dernière étape l'excès d'anticorps secondaire a été lavé 3 fois avec du DPBS+/+ et les cellules ont été incubées avec une solution de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI ; Sigma-Aldrich) à 200nM puis lavées à nouveau 2 fois.

Afin d'évaluer le bruit de fond associé à l'utilisation d'anticorps secondaires couplés à des fluorochromes, un contrôle sans anticorps primaire a été réalisé pour chaque

immunomarquage. Dans ce cas, après l'étape de saturation les cellules ont été incubées dans du DPBS+/- 2% BSA 1h à température ambiante.

E2. Dans les cellules endommagées

La principale difficulté pour l'observation des protéines endogènes d'intérêts dans les cellules endommagées était de pouvoir retrouver les cellules irradiées après l'immunomarquage. Pour contourner ce problème les cellules ont été cultivées sur des supports circulaires appelés MatTek. Avant irradiation, grâce à l'utilisation de l'objectif 10X à immersion, nous avons noté la case contenant les cellules d'intérêt. Le champ d'observation a été centré sur la première cellule d'intérêt et un agrandissement à l'objectif 63X à immersion a été réalisé. Les cellules ont été irradiées dans les conditions expérimentales décrites précédemment mais dans du DPBS sans FM1-43 pour éviter les perturbations de fluorescence entre ce fluorochrome et les fluorochromes conjugués aux anticorps secondaires utilisés lors des marquages. Une fois la cellule d'intérêt irradiée l'acquisition a été arrêtée et une autre cellule a été irradiée. Entre chaque irradiation, l'objectif 10X à immersion a été utilisé pour repérer la position exacte sur la grille. Après la dernière irradiation les cellules ont été immédiatement fixées et immunomarquées dans les conditions décrites précédemment. Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes. Deux expériences indépendantes consistent à analyser des cellules à des jours différents pour des nombres de passages différents et avec des solutions de DPBS fraîches. Lors de chaque expérience entre 3 et 7 cellules ont été irradiées.

Les expériences standards ont été réalisées en DPBS+/- supplémenté de 1mM de chlorure de calcium (CaCl_2). Notre témoin négatif a consisté à utiliser du DPBS-/-.

E3. Protocole d'observation des cellules endommagées

Les observations de la localisation des protéines d'intérêt dans les cellules endommagées ont été faites avec le microscope inversé Olympus IX81. Les cases dans lesquelles ont été irradiées les cellules ont été recherchées à faible grossissement en transmission. Des photos en transmission puis en fluorescence ont été prises à faible grossissement puis à fort grossissement. Le protocole a été répété pour chacune des cellules observées.

Toutes les images obtenues et enregistrées ont ensuite été analysées avec le logiciel ImageJ Macbiophotonics.

E4. Expérience de microscopie corrélative

Pour les observations en microscopie corrélative (microscopie de fluorescence/microscopie électronique), les cellules ont été cultivées et irradiées comme indiqué dans le **paragraphe D2.b**. Après irradiation, les cellules ont été fixées au glutaraldéhyde 1% pendant 20min, à température ambiante (T.A.). Les fonctions aldéhydes restées libres ont ensuite été bloquées

par du chlorure d'ammonium à 25mM pendant 20min à T.A. Les cellules ont été perméabilisées et saturées par une solution de PBS/BSA 2%/Triton 0.1% pendant 30min à T.A. L'anticorps monoclonal de souris anti-AnxA5 (Sigma), dilué au 1/400 dans la solution de saturation, a été incubé 1h à T.A. Après trois lavages, l'anticorps anti-IgG de souris couplé à l'AlexA88 et à des particules d'or (FluoroNanogold, Nanoprobes), dilué au 1/100 en solution de saturation, a été incubé pendant 1h à T.A. Après lavages, les cellules ont été observées en microscopie de fluorescence. Les cellules ont ensuite été post-fixées pendant une nuit à 4°C, dans une solution de cacodylate 0.1M contenant 4% de paraformaldéhyde et 2% de glutaraldéhyde. Après plusieurs lavages à l'eau, une amplification à l'argent a été réalisée en utilisant le kit HQ Silver (Nanoprobes). Après lavage en tampon cacodylate 0.1M, les cellules ont été traitées par 1% de tetroxyde d'osmium pendant 10min à T.A. Les cellules ont ensuite été déshydratées par des bains d'éthanol de concentration croissante. Après un bain en oxyde de propylène, elles ont été incluses en résine Epon-Araldite. Des coupes fines (65nm) ont été obtenues par un ultramicrotome EM UC7 (Leica). Les coupes ont ensuite été marquées à l'actétate d'uranyl et au citrate de plomb, avant observation par le microscope électronique CM120 (FEI) à 120kV. Les images ont été acquises par une caméra USC1000-SSCCD (Gatan).

F. Annexines extracellulaires :

F1. Localisation de l'Annexine-A5 extracellulaire dans les cellules musculaires endommagées

Les cellules ont été incubées dans du DPBS+/+ supplémenté de 1mM CaCl₂ et 5µg/ml d'AnxA5 couplée à la Cyanine-3, sur de la glace durant 5min avant irradiation. La rupture mécanique de la membrane a été générée comme décrit dans le **chapitre D, paragraphe D2** mais en absence de FM1-43 pour éviter des interférences de fluorescence entre la Cyanine-3 et le FM1-43. Le signal de fluorescence de la Cyanine-3 a pu être observé par l'utilisation d'un laser de 543nm à 40% de son intensité maximale et un enregistrement de l'émission de fluorescence sur un spectre allant de 560nm à 650nm.

F2. Annexine-A5 extracellulaire et réparation membranaire

Les myotubes de la lignée LHCN-M2 dont l'expression de l'AnxA5 a été diminuée par une approche de knock-down (**voir chapitre H**) ont été irradiés comme décrits dans le **chapitre D, paragraphe D2** en présence d'AnxA5 extracellulaire non marquée à une concentration de 10µg/ml et en présence de FM1-43 à une concentration de 5µg/ml. Deux formes d'AnxA5 recombinantes ont été utilisées.

- Une AnxA5 sauvage recombinante de rat
- Une AnxA5 recombinante de rat modifiée pour 5 acides aminés (R16E, R23E, K27E, K56E, K191E) capable de se lier aux bicouches lipidiques contenant de la PS avec la même affinité

que l'AnxA5 sauvage (Bouter et al. 2011) mais incapable de s'auto-assembler pour former des réseaux-2D.

G. Imagerie en temps réel : EGFP-Annexine-A5 :

G1. Amplification et extraction du plasmide pDEST14 EGFP-Annexine-A5

160ng de plasmide ont été utilisés pour transformer la souche bactérienne *Escherichia coli* XL1-Blue. 200µl d'une suspension de cette bactérie compétente ont été mélangés aux 160ng de solution plasmidique et incubés 40min à 4°C, puis 2min au bain-marie à 42°C, puis dans la glace. Les 200µl de mélange de la suspension bactérienne et du plasmide ont été mélangés à 800µl de milieu de culture LB sans antibiotiques pendant 1h à 37°C. 100µl du mélange ont été étalés sur une boîte de pétri et incubés à 37°C pendant 24h. Une colonie d'intérêt a été récupérée et amplifiée pendant 24h dans du milieu LB. Après les 24h d'incubation la suspension bactérienne a été centrifugée à 6000g, 4°C pendant 15min.

Le plasmide amplifié a été extrait des bactéries transformées à l'aide du kit Plasmid DNA purification MIDI PREP (MARCHEREY-NAGEL).

Le plasmide contenant la séquence recombinante nous a été fourni par Guillaume Pidoux (INSERM U1139, Université Paris Descartes, Paris, France). La méthodologie pour la construction du plasmide recombinant est décrite dans l'article (Pidoux et al. 2014).

G2. Transfection des myoblastes

Pour transfecter les cellules avec le plasmide contenant la séquence codant l'EGFP-AnxA5 nous avons choisi d'utiliser des lipides cationiques.

Nous nous sommes inspirés de l'article « *Improved transfection technique for adherent cells using a commercial lipid reagent* (Escobedo et Koh 2003) » et des recommandations de Life Technologies pour mettre au point notre protocole de transfection des myoblastes.

a-Transfection reverse (cellules décollées du support de culture) :

La solution de transfection a été préparée avant le passage des cellules. Le protocole décrit est adapté pour des cellules dans un puits de Lab-tek 8puits. Dans un tube eppendorf A de 1,5ml, 1,01µl (1µg) de plasmide a été ajouté à 49µl de milieu OPTI-MEM® à 37°C (volume final 50µl). Dans un tube eppendorf B de 1,5ml, 1,3µl de lipofectamine 2000 (Life Technologies) a été ajouté à 48,7µl de milieu OPTI-MEM® à 37°C (volume final 50µl). Les contenus des tubes A et B ont été mélangés et laissés 20min à température ambiante. Pendant ce temps les cellules à transfecter ont été passées. Après passage 4×10^4 cellules ont étéensemencées en Lab-Tek 8 puits et les 100µl de solution de transfection (milieu OPTI-MEM® contenant les complexes ADN-lipides cationiques) ont été ajoutés goutte à goutte sur l'ensemble de la surface du puits. La solution de transfection a été diluée en ajoutant 100µl de milieu OPTI-

MEM® à 37°C et le tout a été homogénéisé. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 4h dans les conditions standards de culture. Après 4h d'incubation le milieu de transfection a été retiré du puits par aspiration et remplacé par du milieu de culture complet pendant 20h.

b-Transfection forward (cellules adhérentes au support de culture) :

20h après la fin de l'étape de transfection reverse, les cellules ont été transfectées une nouvelle fois. Les cellules ont d'abord été incubées dans 400µl, par puits, de milieu OPTI-MEM® à 37°C pendant 30min. En parallèle la solution de transfection a été préparée dans les mêmes conditions que pour la transfection reverse. Après 30min d'incubation, les cellules ont été transfectées dans les mêmes conditions que pour l'étape de transfection reverse. Les cellules exprimant l'EGFP-AnxA5 ont été utilisées après au moins 20h de culture.

G3. Transfection des myotubes

Puisque ils ne ré-adhèrent pas au support de culture si ils sont décollés de ce support. Les myotubes n'ont donc pas été transfectés avec le protocole de transfection reverse. Les myotubes à 3 jours d'induction de la fusion ont été transfectés avec 2 transfections forward successives de 6h et incubés dans du milieu de différenciation après chaque étape de transfection.

G4. Observation des cellules EGFP-Annexine-A5

Les cellules transfectées ont été utilisées dans des expériences de réparation membranaire sans utilisation de fluorochromes (FM1-43, protéines marquées,...) comme décrit dans le chapitre D, mais également dans des expériences de réparation membranaire après rupture de la membrane plasmique par la SLO (**voir chapitre D2**). Les observations ont été réalisées à l'aide du cube de fluorescence U-MINIBA2.

H. Diminution (knock-down) de l'expression de l'Annexine-A5 dans les myotubes : interférence par des petits ARN à structure en épingle à cheveux (shRNA) et utilisation de particules lentivirales recombinantes :

Le problème principal pour la transfection des myotubes est que ces cellules sont qualifiées de post-mitotiques ou quiescentes. Ces cellules sont nommées ainsi car elles perdent leur capacité de division ; or des travaux ont mis en exergue que l'efficacité de transfection par des lipides cationiques nécessite une activité mitotique (Mortimer et al. 1999).

H1. Partie théorique

a-Les petits ARN interférants (small interfering RNA ou siRNA) :

Il y a 17 ans Graig. C. Mello et Andrew Fire publiaient un article sur leur découverte, qui allait rapidement devenir une des avancées les plus remarquables, en sciences du vivant, du 21^{ème} siècle : l'interférence par ARN. Dans leur publication « *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans** » (Fire et al. 1998), ils montraient, chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, que l'injection de petits ARN double brins provoquait la dégradation de l'ARNm complémentaire avec pour conséquence une extinction de l'expression des protéines codées par ces ARNm.

La mise en évidence en 2001 par Sayda M. Elbashir et Thomas Tuschl que ce mécanisme existe chez les cellules de mammifères en culture (Elbashir et al. 2001) a contribué à la rapidité avec laquelle les connaissances théoriques et pratiques se sont accumulées. Ainsi en 2002 l'interférence par ARN était élue technologie de l'année par le magazine Science et 4 années plus tard Mello et Fire étaient récompensés du prix Nobel de médecine.

Aujourd'hui l'interférence par ARN regroupe un ensemble de mécanismes. Tous ces mécanismes ont pour conséquences la destruction de l'ARNm cible ou l'inhibition de la traduction de cet ARNm. Les différences se font sur l'origine, la structure et les protéines reconnaissant/utilisant les ARN interférants. Pour donner un schéma très simplifié du mécanisme général de l'interférence par ARN nous pouvons nous focaliser sur le mécanisme découvert par Fire et Mello et qui est très utilisé en laboratoire : les ARNsi pour « ARN small interfering » (petits ARN interférants).

L'introduction de petits ARN double brins dans une cellule eucaryote est suivie de leur reconnaissance par un complexe protéique nommé DICER/TRBP qui les clive en ARNsi de 21 paires de bases environ. Le complexe constitué du ARNsi néo-synthétisé et du dimère Dicer/TRBP rejoint la protéine Argonaute 2 pour former le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Le brin sens appelé également brin passager du ARNsi est détruit et le brin complémentaire (antisens/guide) est chargé sur Argonaute 2 pour créer le complexe RISC activé. Le RISC s'apparie alors avec les ARNm présentant une homologie parfaite de séquence avec le brin guide et les détruit ce qui provoque l'extinction de l'expression de la protéine codée par l'ARNm ciblée (**Figure 4**).

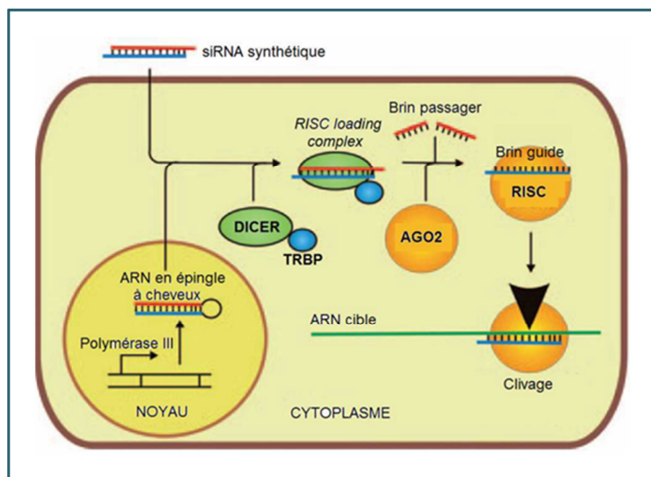


Figure 4 : Mécanismes intracellulaires simplifiés d'interférence par ARN dans le cas des ARNsi et ARNsh (en épingle à cheveux). Dans une cellule eucaryote les petits ARN double brins sont reconnus par un complexe protéique nommé DICER/TRBP qui les clive en ARNsi de 21 paires de bases environ. Le complexe constitué du ARNsi néo-synthétisé et du dimère Dicer/TRBP rejoint la protéine Argonaute 2 pour former le RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Le brin sens de l'ARNsi est détruit et le brin complémentaire est chargé sur Argonaute 2 pour créer le complexe RISC activé. Le RISC

détruit alors les ARNm présentant une homologie parfaite de séquence avec le brin guide et les détruits ce qui provoque l'extinction de l'expression de la protéine codée par l'ARNm ciblée. L'ARNsh, est exporté dans le cytoplasme et il est traité comme un ARNsi. Figure tirée de l'article (Kurreck 2009).

b-Les petits ARN à structure en épingle à cheveux (short hairpin RNA ou shRNA) :

C'est en 2002 que Reuven Agami, Thijn R. Brummelkamp et René Bernards proposent une alternative à l'ARNsi. Cette alternative basée sur le même mécanisme que l'ARNsi est appelée ARNsh pour « ARN short hairpin » (Brummelkamp, Bernards, et Agami 2002). Dans cette étude, ils mettent au point une construction plasmidique nommée pSUPER (Suppression of Endogenous RNA), un plasmide dans lequel ils clonent une séquence d'ADN composée d'une séquence de 19 nucléotides et sa séquence complémentaire, sous forme palindromique, séparées par une séquence intermédiaire. Le tout placé sous le contrôle d'une séquence promotrice de l'ARN polymérase III (ARN pol III) (**Figure 5**).

L'utilisation d'un promoteur de l'ARN polymérase III a plusieurs avantages. D'abord l'ARN pol III transcrit les gènes dits de « classe 3 » en petits ARN non traduits, de taille généralement inférieure à 400pb. Ensuite l'ARN pol III produit des transcrits dépourvus de coiffe ou de queue polyA, le signal de terminaison de la transcription étant 5 bases thymidine consécutives, ce qui implique une transcription de séquences plus franches qu'avec l'ARN pol II. L'introduction d'un tel plasmide dans la lignée humaine MCF-7 entraîne la production par la machinerie cellulaire de petits ARN double brins avec une structure en épingle à cheveux (**Figure 5**). Ces ARN sont également reconnus par Dicer/DRBP et sont transformés en ARNsi (**Figure 4**). L'étude montre une efficacité de diminution de l'expression de protéines cibles égale à l'utilisation directe de l'ARNsi correspondant.

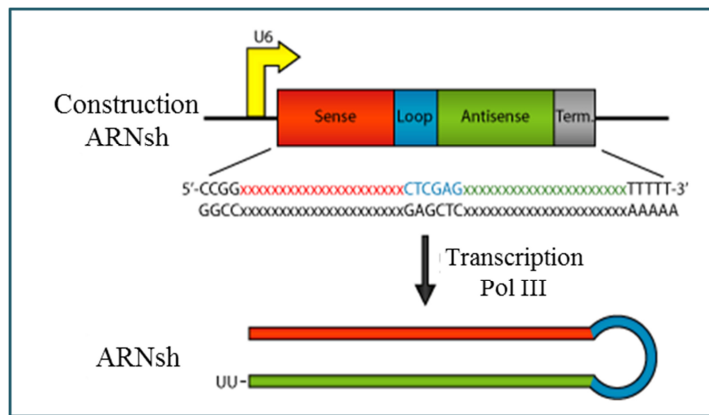


Figure 5 : Structure générale d'une séquence codant un ARNsh sous le contrôle d'un promoteur de l'ARN pol III et structure générale d'un ARNsh.

Dans un plasmide une séquence d'ADN composée d'une séquence de 19 nucléotides (sense) et sa séquence complémentaire sous forme palindromique (antisense) séparées par une séquence intermédiaire (loop) sont placées sous le contrôle du promoteur de l'ARNpolIII. Lorsque ce plasmide est introduit dans une cellule l'ARNpolIII

transcrit la séquence pour former un petit ARN double brin en forme d'épingle à cheveux. Figure tirée du site Addgene.

Cependant les avantages de l'utilisation de ce type de construction est que l'interférence produite est plus longue et stable que l'injection directe d'ARNsi. En effet alors que les ARNsi intracellulaires sont utilisés et dégradés progressivement au cours du temps, les ARNsh sont continuellement exprimés par la cellule ce qui permet une production en continu des ARNsi.

Ce type de construction peut être utilisé avec des nouveaux vecteurs plus efficaces que les vecteurs jusqu'alors employés, comme les particules lentivirales.

c-Les vecteurs lentiviraux :

L'utilisation de vecteurs dérivés de virus, et notamment de rétrovirus pour l'introduction de gènes dans des cellules s'est développé durant les années 80. Le but de ces travaux était de mettre au point des techniques permettant l'introduction efficace et stable de gènes pour le remplacement de gènes défectueux dans des cellules cibles de patients souffrant de pathologies d'origine génétique. Il s'est avéré que les vecteurs rétroviraux alors développés étaient très peu efficaces pour des cellules quiescentes (qui ne se divisent pas) (Miller, Adam, et Miller 1990). Les chercheurs se sont alors rapidement tournés vers l'utilisation de particules dérivées du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) qui est le membre le plus connu de la sous-famille des *Lentivirus*. Ces virus ont en effet la capacité d'infecter et d'intégrer leurs gènes dans le génome des cellules qui ne prolifèrent pas et permettent une expression stable et à long-terme d'une protéine d'intérêt par des cellules cibles. La première génération de vecteurs dérivés du VIH-1 a vu le jour au milieu des années 90 (Naldini et al. 1996) et pour des raisons évidentes de problèmes potentiels de nocuité que pose la manipulation et l'utilisation *in vivo* de ce type de vecteurs, les chercheurs ont développés des systèmes de production et des constructions de vecteurs de plus en plus sécurisées.

d-Production de particules lentivirales :

Plusieurs générations de vecteurs lentiviraux ont vu le jour avant le début des années 2000. Actuellement les particules lentivirales qui sont le plus produites sont dites de 2^{ème} génération. L'utilisation de telles particules comme vecteurs d'ARN d'interférence a commencé environ 5 ans après la publication de Fire et Mello (Tiscornia et al. 2003). Avant l'utilisation de ce type de vecteurs, une limitation des ARNsh était une perte progressive de l'efficacité d'inhibition de la traduction des protéines d'intérêt dans les cellules en prolifération par dilution des plasmides ou ARNsi (partage du contenu cellulaire d'une cellule mère ses deux cellules filles au cours de la mitose). En simplifiant au maximum, la technique de production de ces particules de 2^{ème} génération consiste (**Figure 6**) en la transformation d'une lignée cellulaire humaine créée spécialement pour la production de particules virales (HEK293T) avec 3 plasmides permettant la production de particules virales incompetentes à la réplication. 2 des 3 plasmides codent les gènes essentiels à l'assemblage de particules virales : le plasmide d'encapsidation (Packaging plasmid) permet la production de l'ensemble des protéines de la capsid (enzymes + protéines de structure) ; le plasmide d'enveloppe (Envelope plasmid) permet la synthèse de la glycoprotéine d'enveloppe qui s'associe à la membrane cellulaire pour former l'enveloppe des particules sortant de la cellule par bourgeonnement. Les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp40 ont été remplacées par la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G). Cette glycoprotéine possède un tropisme pour un très grand nombre de cellules. Enfin le dernier plasmide nommé plasmide vecteur (transfer plasmid, dans notre cas il s'agit du plasmide pLKO.1 puro) contient les séquences d'intégration dans le génome de la cellule hôte (LTR), la séquence ARNsh d'intérêt, la séquence d'encapsidation psi (ψ) ainsi qu'une séquence codant un marqueur de sélection (protéine fluorescente, résistance à un antibiotique). Le plasmide de transfert est transcrit par les cellules HEK293T en ARN viral qui sera incorporé dans les particules néoformées. L'absence de séquence d'encapsidation dans les autres plasmides implique que les séquences codant les protéines de structure et d'enveloppe ne seront pas présentes dans les particules virales produites par les cellules HEK293T.

Ces particules sont donc dépourvues de pouvoir de réplication. Une fois les particules virales en interaction avec les cellules cibles, elles suivent le même schéma d'infection que le VIH sauvage aboutissant à l'intégration de la cassette de transfert, sous forme d'ADN double brin, dans le génome de la cellule hôte. Ainsi les cellules cibles exprimeront constitutivement les ARNsh provoquant le knockdown constitutif de l'expression de la protéine d'intérêt.

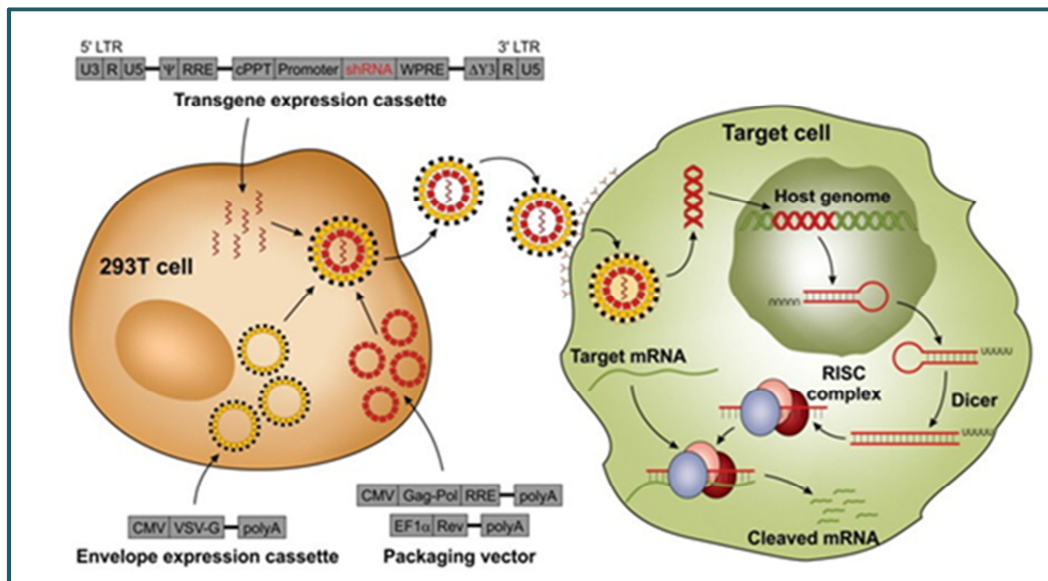


Figure 6 : Représentation schématique de la production de particules lentivirales de secondes générations et de diminution de l'expression d'une protéine d'intérêt dans des cellules cibles. La technique de production de ces particules de 2^{ème} génération consiste en la transformation de la lignée cellulaire humaine HEK293T avec 3 plasmides : le plasmide d'encapsidation (Packaging plasmid) permet la production de l'ensemble des protéines de la capsid ; le plasmide d'enveloppe (Envelope plasmid) permet la synthèse de la glycoprotéine d'enveloppe ; le plasmide vecteur (transfer plasmid) qui contient les séquences d'intégration dans le génome de la cellule hôte (LTR), la séquence ARNsh d'intérêt, la séquence d'encapsidation psi (Ψ) ainsi qu'une séquence codant un marqueur de sélection (protéine fluorescente, résistance à un antibiotique). Le plasmide de transfert est transcrit par les cellules HEK293T en ARN viral puis est incorporé dans les particules néoformées. Une fois les particules virales en interaction avec les cellules cibles, elles suivent le même schéma d'infection que le VIH sauvage aboutissant à l'intégration de la cassette de transfert, sous forme d'ADN double brin, dans le génome de la cellule hôte. Ainsi les cellules cibles exprimeront constitutivement les ARNsh provoquant le knockdown constitutif de l'expression de la protéine d'intérêt. Figure tirée du livre Molecular Therapies co-écrit par Dr. Zoltán Balajthy, Dr. János Aradi, Dr. Zoltán Balajthy, Dr. Éva Csösz, Dr. Beáta Scholtz, Dr. István Szatmári, Dr. József Tözsér, Dr. Tamás Varga (2011 ; Université de Debrecen ; Hongrie)

H.2 Partie pratique

Une séquence commerciale :

5' **CCGGCGCGAGACTTCTGGCAATTTACTCGAGTAAATTGCCAGAAGTCTCGCGTTT** 3' clonée dans un plasmide pLKO.1 puro de chez Sigma-Aldrich (MISSION® shRNA plasmid DNA (SHCLND), Sigma-Aldrich) a été utilisée pour le knock-down de l'Annexine-A5 dans les myotubes. Les particules lentivirales recombinantes contenant le plasmide d'intérêt ont été produites par la plateforme de vectorologie de Bordeaux (US005, Université de Bordeaux site Carreire) avec les conseils et l'aide précieuse de Véronique Guyonnet Dupérat et d'Alice Vimeney et selon la technique décrite précédemment (**Figure 6**).

Comme il est difficile voir impossible d'avoir une estimation du nombre de myotubes par puits en Lab-Tek 8puits nous avons postulé qu'il faut autant de particules pour transduire (infecter) un myotube provenant de la fusion de 50 myoblastes (50 noyaux) que 50 myoblastes individuels. Ainsi nous avons estimé pour une confluence de 90%, avant la fusion, il y a dans un puits de 0,7cm² 80 000 myoblastes. Nous avons calculé un nombre de particules sur la base de ce nombre. Après plusieurs tests nous avons retenus une MOI (Multiplicity of Infection qui correspond au nombre moyen de particules virales par cellule lors de l'infection) de 100 comme étant optimale. Ce chiffre correspond à 80 000 x 100 particules par puits, soit 8x10⁶ de particules par puits. Les myotubes à J3 ont été transduits à une MOI de 100 dans un volume de 250µl d'OPTI-MEM® par puits en veillant à ce que le volume de particules ne dépasse pas 10% du volume total. L'infection a été faite à 37°C en condition normale de culture pendant 24h. Le lendemain, le milieu de transduction a été retiré des puits et remplacé par du milieu de différenciation et les cellules ont été placées pendant 24h supplémentaires dans l'incubateur. Les myotubes transduits ont été sélectionnés par incubation dans du milieu de différenciation supplémenté de 2µg/ml de puromycine (Sigma-Aldrich) pendant 24h en conditions standard de culture. Le jour suivant les myotubes ont été utilisés pour les expériences. Au moins 4h avant les expériences, le milieu de sélection a été changé par du milieu de différenciation.

Dans les myotubes contrôle nous avons utilisé une séquence contrôle aspécifique ne reconnaissant aucune séquence d'ARNm codant les protéines humaines. Cette séquence nous a été fournie par la plateforme de vectorologie de Bordeaux.

Séquence contrôle :

5'**CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG**CTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG^{3'}

La condition non transduite (NT) correspond à des cellules traitées comme les cellules transduites mais en absence de particules lentivirales et de l'étape de sélection en milieu de différenciation supplémenté de puromycine.

I. Test de contractilité des myotubes *in vitro* :

Les myotubes, ont été incubés à J3, J4 ou J5 dans 1ml de tampon de Krebs (Hepes 10mM, 136mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM D-glucose, tamponné PH 7,4) 30min à 37°C. Après incubation, les cellules ont été placées sur le microscope inversé (OLYMPUS IX 81) à faible grossissement et à température ambiante. Lorsqu'un champ d'intérêt a été sélectionné le tampon de Krebs a d'abord été retiré du puits délicatement par aspiration, puis l'enregistrement d'une acquisition en continu a été lancée (Cell[^]F software). L'instant T0 correspond à l'ajout dans le puits d'intérêt de 1ml de tampon de dépolarisation (Hepes 10mM, 1mM NaCl, 140mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM D-glucose, tamponné PH 7,4). Les documents enregistrés en format avi ont été ensuite ré-analysés à l'aide du logiciel ImageJ Macbiophotonics.

Résultats et conclusions

Partie A : Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines.

Chapitre n°1 : Caractérisation des modèles cellulaires

L'identification des différents partenaires de la machinerie de réparation est devenue un enjeu important depuis qu'un lien direct a été établi entre la défaillance du processus de réparation membranaire et le développement de certaines dystrophies musculaires (Bansal et al. 2003). L'élaboration de cette liste exhaustive nécessite de développer des outils fiables permettant l'obtention de résultats reproductibles et potentiellement transposables à l'Homme. Actuellement la majorité des travaux sur la réparation membranaire et la physiopathologie des dystrophies musculaires privilégient l'utilisation de lignées cellulaires plutôt que des cultures primaires. En effet, comme toutes les cultures primaires, les fibres musculaires striées squelettiques sont sujettes au phénomène de dégénérescence répllicative. La dégénérescence répllicative ou sénescence cellulaire est un phénomène multifactoriel décrit pour la première fois en 1961 par Léonard Hayflick et Paul Moorhead (Hayflick et Moorhead 1961). Elle se caractérise par l'entrée des cellules en culture dans une phase d'arrêt irréversible de leur croissance, accompagnée de nombreux changements morphologiques et métaboliques (sénescence). Les cultures primaires de cellules ont donc une capacité de prolifération limitée et le phénomène de sénescence implique la possibilité de variations du transcriptome et protéome au cours du temps, malgré des conditions de culture inchangées. D'autre part, dans le cas de patients atteints de dystrophies musculaires pour lesquels le tissu musculaire est peu à peu remplacé par du tissu fibreux, les prélèvements d'une quantité suffisante de fibres musculaires sont contraignants et douloureux ce qui diminue considérablement la possibilité de les répéter sur un même individu. Or, le changement fréquent de la source de prélèvement peut entraîner des variabilités de résultats ayant pour origine la variabilité interindividuelle (génétique, épigénétique,...) des patients prélevés. Même si elles peuvent présenter des différences avec les cultures primaires parentales, les lignées cellulaires, qui ont une durée de vie beaucoup plus longue, sont une bonne alternative à ces problèmes.

La majorité des études sur la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques saines ou pathologiques utilisent des lignées établies à partir de tissu musculaire de souris ou de rat (les lignées C2C12 ou L6 respectivement, par exemple). Or, des travaux *in vivo* avec des souris transgéniques modèles d'étude de la dystrophie de Duchenne, ont montré d'importantes différences physiopathologiques entre l'humain et la souris (Collins et Morgan 2003). Ces différences restreignent de façon notable la possibilité d'étendre les connaissances acquises chez l'animal à l'Homme.

Pour cette étude, nous avons privilégié l'utilisation d'une lignée cellulaire de muscle strié squelettique humain, nommée LHCN-M2 (Zhu et al. 2007). Cette lignée a été établie à partir de cellules satellites isolées du muscle grand pectoral (*pectoralis major*) d'un homme

« caucasien » âgé de 41 ans, et ne présentant aucune pathologie du tissu musculaire strié squelettique. Depuis l'élaboration de cette lignée, plusieurs lignées musculaires humaines modèles de dystrophies musculaires ont également été établies en utilisant un protocole similaire (Philippi et al. 2012). Afin de réaliser une étude comparative de la réparation membranaire entre le tissu musculaire sain et des tissus musculaires striés pathologiques, nous avons utilisé la lignée LHCN-M2 comme référence de cellules saines et les lignées 650 et 578, comme modèles d'étude des dystrophies musculaires des ceintures de type 1C et 2B, respectivement.

Peu de données étant publiées sur ces lignées, la première partie de ce travail a consisté à caractériser les cellules de chaque lignée aux stades myoblaste et myotube. Pour cela nous avons mesuré leurs dimensions caractéristiques dans nos conditions de culture. Nous avons également comparé la cinétique de formation des myotubes des trois lignées et nous avons enfin analysé l'organisation et la fonctionnalité de leur cytosquelette contractile.

A. Lignée modèle de muscle strié squelettique humain sain : LHCN-M2

A1. Taille, morphologie et capacité à fusionner

La lignée LHCN-M2 a été cultivée selon les recommandations de la plateforme d'immortalisation des myoblastes humains de l'Institut de Myologie de Paris (UM76, Université Pierre et Marie Curie, Paris), qui nous a fourni ces cellules.

Dans nos conditions de culture les myoblastes sont des cellules mononuclées, qui une fois adhérentes au support de culture, semblent fines et ont une forme majoritairement fusiforme (**Figure 1.1**).

Les myoblastes LHCN-M2 ont en moyenne une longueur de $93 (+/-31) \mu\text{m}$, une largeur de $35 (+/-12) \mu\text{m}$ pour une surface totale de $2001 (+/- 678) \mu\text{m}^2$. Leur noyau occupe en moyenne $13 (+/- 3) \%$ de leur surface totale (**Tableau 1A**).

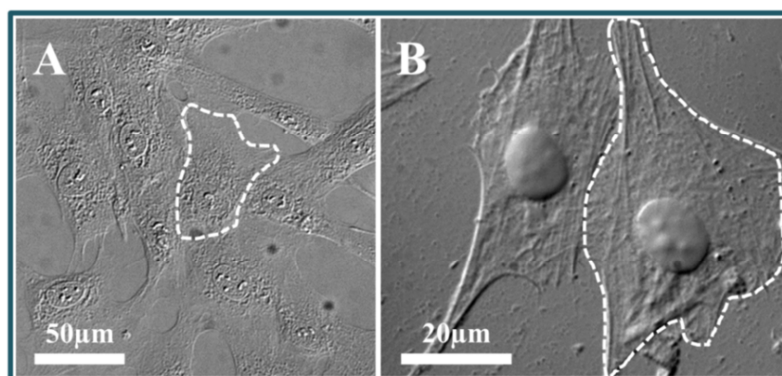


Figure 1.1 : Myoblastes LHCN-M2 en culture à faible (A) et fort grossissement (B). Des myoblastes en culture à une confluence de l'ordre de 50% ont été fixés avec du méthanol à -20°C pendant 5 min et observés en contraste interférentiel différentiel à l'aide du microscope Olympus IX-81. La membrane plasmique d'un myoblaste a été dessinée sous forme de pointillés blancs sur chaque image.

Résultats et conclusions

Caractéristiques morphologiques des myoblastes LHCN-M2	
Longueur (μm)	93 (+/- 31)
Largeur (μm)	35 (+/- 12)
Surface totale (μm^2)	2001 (+/- 678)
Surface nucléaire (μm^2)	245 (+/- 68)
Rapport nucléocytoplasmique (%)	13 (+/- 3)

Tableau 1A : Tableau récapitulatif des principales dimensions des myoblastes LHCN-M2. Les myoblastes ont été cultivés et fixés comme indiqués dans la légende de la **Figure 1.1**. Les données morphologiques correspondent aux moyennes déterminées en analysant un échantillon de 30 cellules, issues de 3 cultures différentes à des nombres de passages différents (10 cellules par culture, 2 champs aléatoires, 5 cellules par champ) à l'aide du logiciel ImageJ. Les données présentées entre parenthèses correspondent aux écart-types.

In vivo les myoblastes sont des cellules qui, sous l'influence de stimuli, ont la capacité de se différencier et fusionner pour donner naissance aux fibres musculaires. *In vitro*, la différenciation/fusion peut être induite en cultivant les myoblastes dans du milieu de culture dépourvu de sérum et d'additifs. L'absence de facteurs de croissance sériques, notamment le « basic Fibroblast Growth Factor » (Clegg et al. 1987), entraîne une différenciation des myoblastes en cellules plus allongées, nommées myocytes. Les myocytes fusionnent ensuite pour former de grandes cellules multinucléées et postmitotiques appelées myotubes. *In vivo*, les myotubes se différencient pour donner les fibres musculaires matures. Actuellement aucun protocole ne permet d'induire la maturation des myotubes en fibres musculaires *in vitro*. Les myotubes perdent leur pouvoir prolifératif durant leur différenciation et ne ré-adhèrent pas aux supports de culture une fois décollés. Il faut donc continuellement les générer à partir de myoblastes en culture.

Pour obtenir des myotubes, nous avons cultivé les myoblastes dans du milieu de culture sans sérum et additifs, supplémenté d'insuline recombinante humaine à une concentration finale de 10 $\mu\text{g/ml}$. La **Figure 1.2** présente la cinétique de différenciation et fusion des myoblastes LHCN-M2 dans ces conditions. Au moment de l'induction de la différenciation, les myoblastes doivent être à une confluence d'environ 80% (**Figure 1.2, J0**). Après 24 heures de culture en milieu de différenciation, la plupart des myoblastes ont un aspect très allongé et s'alignent selon une orientation commune (**Figure 1.2, J1**). Ce stade de différenciation correspond très probablement au stade myocyte. 48h après l'induction de la différenciation, les premières cellules plurinucléées de petite taille, apparaissent (**Figure 1.2, J2**). Afin d'estimer la proportion de myoblastes ayant fusionné au cours du temps, nous avons mesuré l'indice de fusion. Cet indice de fusion est défini comme le rapport (exprimé en pourcentage) entre le nombre de noyaux contenu dans les myotubes sur un champ donné et le nombre de noyaux totaux contenu dans ce même champ. L'indice de fusion représente donc la proportion de myoblastes ayant fusionné sur une période donnée. 48 heures après induction de la fusion,

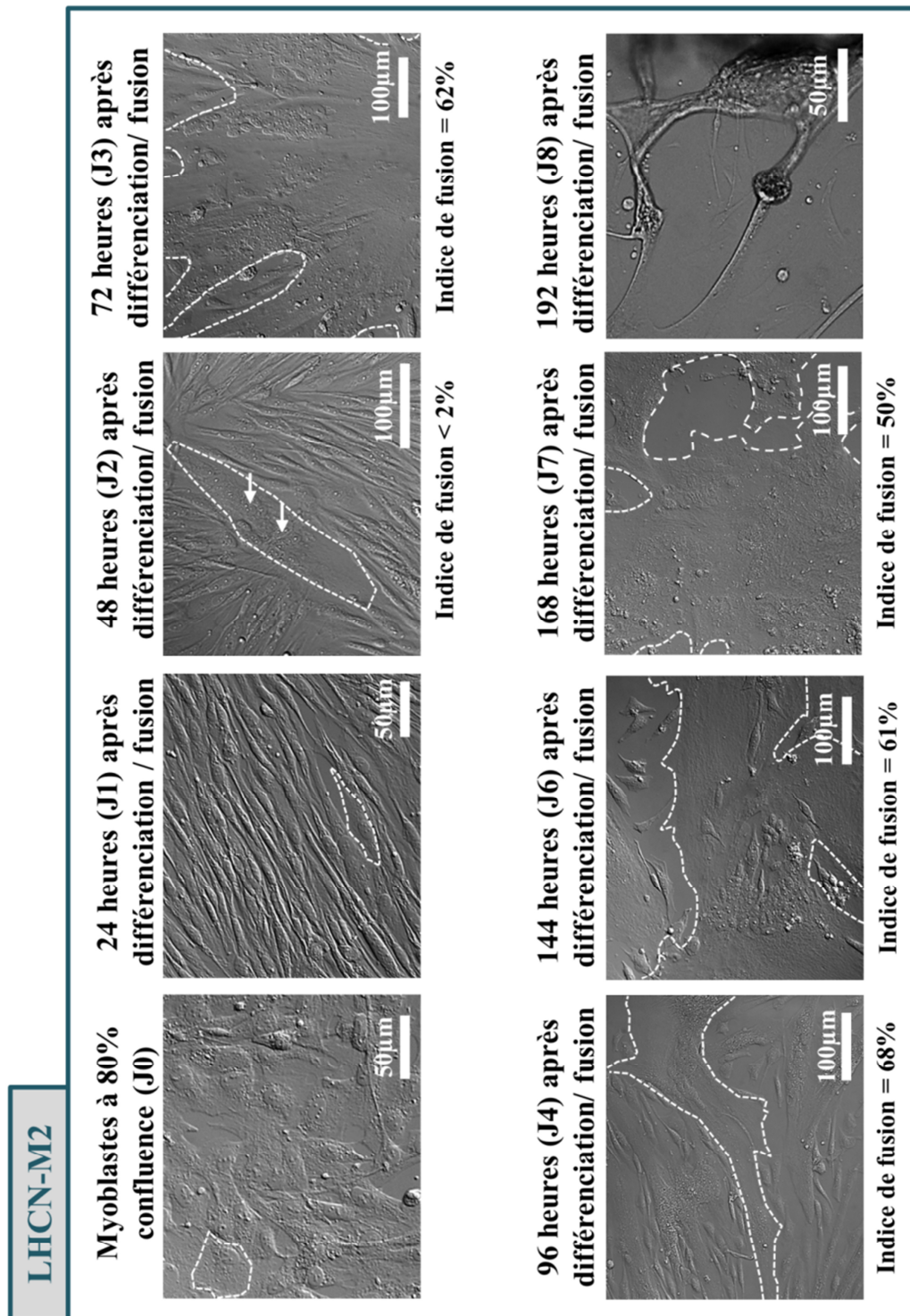


Figure 1.2 : Cinétique de formation des myotubes LHCN-M2 par différenciation et fusion des myoblastes. Des myoblastes à 80% de confluence ont été fixés au méthanol à -20°C pendant 5 min (J0) ou incubés dans du milieu de différenciation et fixés après 24 heures (J1), 48 heures (J2), 72 heures (J3), 96 heures (J4), 144 heures (J6), 168 heures (J7) et 192 heures (J8). Pour chaque condition, l'indice de fusion a été calculé en faisant le rapport du nombre de noyaux dans les myotubes sur le nombre total de noyaux, pour 12 champs aléatoires dans 3 expériences indépendantes. A J1, nous avons observé un allongement et alignement des cellules correspondant au stade myocyte. Les premières cellules plurinucléées apparaissent à J2. A J2, les flèches montrent plusieurs noyaux dans une même cellule. L'indice de fusion est maximal à J4.

Caractéristiques morphologiques des myotubes LHCN-M2 à J3	
Longueur (mm)	0.3 à 2
Largeur (mm)	0.1 à 1
Surface totale (mm ²)	0.03 à 2
Nombre de noyaux par myotube	10 à 1000

Tableau 1B : Tableau récapitulatif des principales dimensions des myotubes LHCN-M2 à J3. Les myotubes ont été cultivés et fixés comme indiqué dans la légende de la figure 1.3. Les données morphologiques ont été estimées en analysant un échantillon de 30 cellules issues de 3 cultures différentes à des nombres de passages différents (10 cellules par culture, 2 champs aléatoires, 5 cellules par champ) à l'aide du logiciel ImageJ.

l'indice de fusion est de l'ordre de 2% (**Figure 1.2, J2**). L'indice de fusion maximal est atteint à J4, où il est d'environ 70% (**Figure 1.2, J4**). A partir de J6, soit 144 heures de culture en milieu de différenciation, nous avons mesuré une diminution de l'indice de fusion (**Figure 1.2, J6**). Cette baisse résulte du décollement des myotubes sénescents (**Figure 1.2, J8**).

L'intervalle de temps permettant l'expérimentation sur des myotubes est donc relativement limité, s'étalant de J3 à J6. Cette courte durée de vie des myotubes LHCN-M2 a restreint l'application de certains protocoles expérimentaux et constitué un des obstacles que nous avons rencontrés durant ce projet de recherche.

Les myotubes LHCN-M2 à J3, observés en microscopie à contraste interférentiel, ont une structure majoritairement en étoile avec des ramifications qui vont dans toutes les directions (**Figure 1.3A**). Il est très difficile d'évaluer la taille de ces cellules car même à faible grossissement (6.3x), il est rarement possible de pouvoir observer un myotube en entier. Nous avons estimé qu'en moyenne les myotubes ont une longueur de l'ordre du mm, une largeur de plusieurs centaines de μm et un nombre de noyaux par myotube pouvant atteindre mille unités (**Tableau 1B**). A fort grossissement (37.8x), nous avons observé que les ramifications des myotubes sont composées de structures filamenteuses parallèles qui pourraient correspondre aux microfilaments d'actine (**Figure 1.3B, flèche blanche**).

A2. Organisation du cytosquelette et test de contractilité

In vivo, la motricité statique et dynamique des individus est assurée par la capacité des fibres musculaires à se contracter et relaxer de façon volontaire. Cette capacité est la conséquence directe de l'acquisition par les cellules musculaires, au cours de leur différenciation, d'un cytosquelette hautement organisé dont l'unité motrice à l'échelle subcellulaire est nommée sarcomère (**Figure 1.4**).

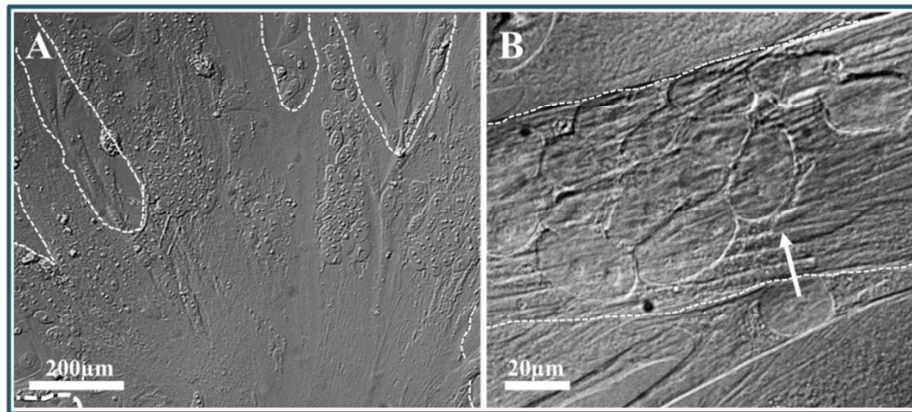


Figure 1.3 : Myotubes LHCN-M2 en culture après 72h (J3) de culture en milieu de différenciation. Les myotubes ont été obtenus à partir de myoblastes à 80% de confluence cultivés pendant 3 jours (J3) en milieu de différenciation. Les myotubes ont été fixés avec du méthanol à -20°C pendant 5 min et observés en contraste interférentiel différentiel à l'aide du microscope Olympus IX-81. La membrane plasmique d'un myotube a été dessinée par des pointillés blancs sur chaque image. En **A**, un myotube observé à faible grossissement. On observe une large zone cytoplasmique avec la présence de ramifications. En **B**, une ramification observée à fort grossissement montre la présence de fibres (flèche blanche), correspondant probablement à des protéines du cytosquelette.

Le muscle strié squelettique est composé de cellules appelées fibres musculaires, regroupées sous forme de faisceaux. Chaque fibre est composée de structures cylindriques appelées myofibrilles et chaque myofibrille est une succession de structures répétées, appelées sarcomères. Le sarcomère, qui est l'unité contractile de la cellule musculaire, est une région de la myofibrille délimitée par deux zones successives denses en actinine- α , appelées stries Z. L'interaction entre les filaments de myosine et d'actine, deux composants majeurs du sarcomère, permet le raccourcissement des sarcomères aboutissant à la contraction musculaire.

Nous nous sommes intéressés à deux protéines composant les sarcomères des fibres musculaires : l'actine et l'actinine- α . L'actine est une protéine globulaire présente chez tous les eucaryotes avec une séquence très conservée. Cette protéine polymérise pour donner naissance à des filaments linéaires à deux brins nommés filaments d'actine ou microfilaments. Il existe trois isoformes d'actine (α , β et γ) chez les vertébrés et un microfilament n'est constitué que d'une seule isoforme. L'actine α est spécifique du tissu musculaire différencié (strié et lisse) alors que les isoformes β et γ sont exprimées uniquement dans les tissus non-musculaires. Dans le muscle strié squelettique, l'actine α est organisée en faisceaux antiparallèles ancrés à une protéine nommée actinine- α . Cette actinine- α est une protéine très conservée parmi les mammifères (Virel et Backman 2004). Elle fait partie de la superfamille des spectrines qui regroupe un ensemble de protéines de liaison à l'actine (Sjöblom, Salmazo, et Djinović-Carugo 2008). Chez les mammifères, il existe six isoformes différentes d'actinine- α . Parmi ces six isoformes, deux isoformes sont retrouvées principalement dans le tissu musculaire strié squelettique, ce sont les actinine- $\alpha 2$ et actinine- $\alpha 3$. Dans la fibre musculaire, l'actinine- α constitue la strie Z (ou ligne Z) et délimite le sarcomère. Elle permet,

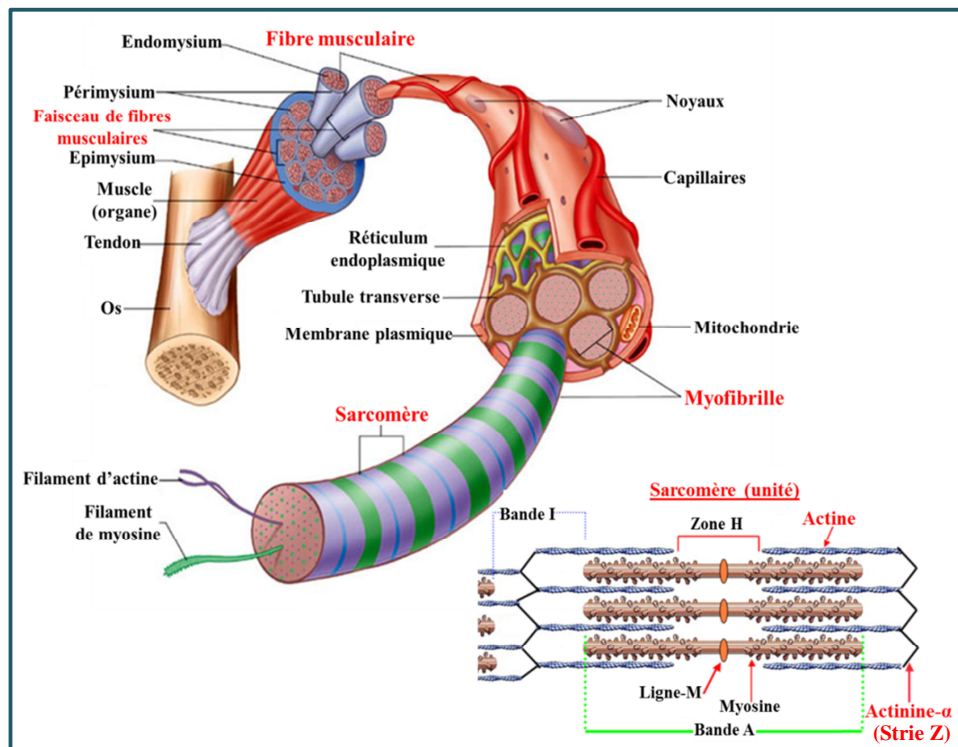


Figure 1.4 : Schéma de la structure interne d'un muscle strié squelettique humain. Un muscle est composé d'un ensemble de faisceaux de fibres musculaires entourées par plusieurs membranes de tissu conjonctif (epimysium, péricomysium, endomysium). Chaque faisceau est un regroupement de fibres, qui sont elles-mêmes organisées en un regroupement de myofibrilles. Ces myofibrilles sont une succession longitudinale de sarcomères. Le sarcomère, qui est l'unité contractile de la cellule musculaire, est une région de la myofibrille délimitée par deux zones successives denses en actinine- α , appelées stries Z. L'interaction entre les filaments de myosine et d'actine, deux composants majeurs du sarcomère, permet le raccourcissement des sarcomères aboutissant à la contraction musculaire. Figure adaptée des sites de l'Université du nouveau-Mexique (www.unm.edu) et de l'Université Francis-Marion (www.fmarion.edu).

sous forme de dimères, de lier deux sarcomères adjacents stabilisant ainsi la structure du cytosquelette (**Figure 1.4**).

Nous avons analysé la distribution subcellulaire de l'actine et l'actinine- α dans les myoblastes et myotubes de la lignée LHCN-M2. L'actine a été marquée à l'aide de phalloïdine conjuguée au fluorochrome TRITC. La phalloïdine est une toxine faisant partie de la classe des phallotoxines et extraite du champignon vénéneux *Amanita Phalloïdes*. Elle pénètre dans les cellules et se fixe à toutes les isoformes de l'actine sous forme filamentueuse (Dancker et al. 1975) empêchant, entre autre, sa dépolymérisation. L'actinine- α a été visualisée après immunomarquage à l'aide d'un anticorps primaire monoclonal généré chez la souris et dirigé contre les isoformes $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de l'actinine- α .

Nous avons observé que, dans les myoblastes, l'actine filamentueuse est dispersée de façon anarchique dans le cytoplasme de la cellule. L'intensité de fluorescence plus forte dans la région proche de la membrane plasmique traduit la présence d'un réseau sous-membranaire de microfilaments (actine corticale) dense (**Figure 1.5A**). L'actinine- α ne semble pas ou très

faiblement exprimée dans les myoblastes en condition de culture (**Figure 1.5B**) comme dans les myoblastes en condition de différenciation (**Figure 1.5D**, **flèche blanche**). Pour les myotubes, nous avons observé que le réseau d'actine se présente sous forme de faisceaux parallèles et orientés dans la même direction que la cellule (**Figure 1.5C**). Cette disposition des filaments d'actine est très similaire à celle observée dans les fibres musculaires, condition indispensable à la contraction musculaire. Contrairement aux myoblastes, l'actinine- α est fortement exprimée dans les myotubes (**Figure 1.5D**). Comme pour l'actine, elle est présente sous forme de fibres parallèles et orientées dans la même direction que les myotubes. Cependant, contrairement à l'actine, le marquage observé est discontinu (**Figure 1.5D**). Ce marquage suggère que l'actinine- α est en association avec l'actine et en structures répétées, pouvant correspondre aux stries Z.

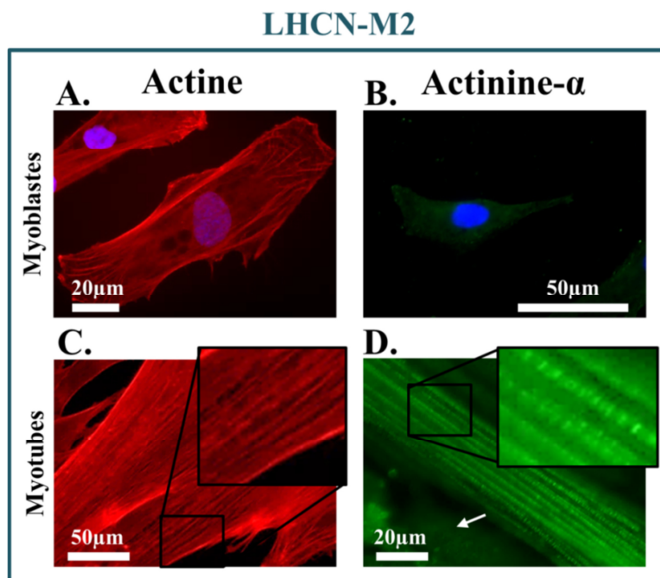


Figure 1.5 : Distribution subcellulaire de l'actine et l'actinine- α dans les myoblastes et myotubes de la lignée LHCN-M2. Des myoblastes (A et B) et des myotubes (C et D) cultivés comme indiqué dans les légendes des figures 1.1 et 1.3, respectivement, ont été fixés au méthanol à -20°C pendant 5min. L'actinine- α a été immunomarkée à l'aide d'un anticorps primaire monoclonal de souris et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 (vert). Le marquage de l'actine a été réalisé à l'aide de phalloïdine conjuguée au TRITC (rouge). Dans les myotubes, les microfilaments d'actine (C) sont organisés en faisceaux parallèles ayant la même direction que les cellules, alors que dans les myoblastes (A) leur agencement semble complètement désorganisé. L'actinine- α , spécifiquement exprimée par les myotubes, s'organise sous forme de faisceaux alignés dans la même direction que la cellule (D). L'aspect ponctué du marquage de cette protéine suggère qu'elle est répartie en structures répétées, pouvant correspondre aux stries Z.

En complément de cette analyse structurale du cytosquelette, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle en testant la capacité de contraction des myotubes LHCN-M2 *in vitro*. La contraction volontaire du tissu musculaire strié squelettique *in vivo* est la conséquence d'une stimulation des fibres musculaires par un motoneurone. Lorsqu'un motoneurone est excité, le potentiel d'action qui le traverse sous forme d'influx nerveux est transmis jusqu'à la terminaison axonale, provoquant la libération d'un neuromédiateur (l'acétylcholine) au niveau de la jonction neuromusculaire. L'acétylcholine libérée va alors diffuser dans la fente synaptique et se lier à la cellule musculaire au repos via le récepteur nicotinique à l'acétylcholine. L'association ligand-récepteur entraîne une dépolarisation de la membrane sarcoplasmique causée par une entrée massive de Na^+ . La dépolarisation de la membrane sarcoplasmique entraîne une libération calcique importante du réticulum sarcoplasmique dans

le sarcoplasme. L'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} entraîne la contraction musculaire.

La mise en place de jonctions neuromusculaires fonctionnelles nécessite la présence de motoneurones et de cellules de Schwann (Dennis 1981). Comme les cultures cellulaires utilisées sont dépourvues de motoneurones, un tel mécanisme ne peut être reproduit *in vitro*. Il est cependant possible de faire contracter *in vitro* les cellules musculaires striées squelettiques (Frank 1960) en augmentant la concentration extracellulaire en K^+ (Hodgkin et Horowicz 1960). Ce phénomène, connu sous le nom choc potassique, consiste à ajouter un excès de K^+ dans le milieu extracellulaire afin de diminuer le potentiel d'équilibre de cet ion. Ceci entraîne une dépolarisation de la membrane sarcoplasmique au-delà du seuil nécessaire pour l'initiation des phénomènes moléculaires associés à la contraction (Adrian 1956).

Le protocole que nous avons utilisé a été adapté d'une étude réalisée sur des cellules musculaires de rat (Rezgui et al. 2005). Après une pré-incubation des cellules dans un tampon physiologique contenant 136mM NaCl et 5mM KCl pendant 30 min à 37°C, les myotubes ont été placés dans un tampon de dépolarisation contenant 1mM NaCl et 140mM KCl. Dans ces conditions, le chlorure de K^+ est ajouté en large excès sans modification de l'osmolarité. La présence de K^+ à forte concentration dans le milieu extracellulaire entraîne le phénomène de choc potassique et mime les effets d'une dépolarisation de la membrane par le biais de la liaison de l'acétylcholine sur son récepteur *in vivo*.

La **Figure 1.6** présente les résultats observés après incubation de myotubes LHCN-M2 à J3 dans le tampon de dépolarisation. Nous avons observé que la contraction des myotubes se produit, le plus souvent, dès les premières secondes après ajout du tampon de dépolarisation (**Figure 1.6, +6s**). Contrairement aux conditions physiologiques, où les fibres musculaires libèrent dans l'espace intersynaptique de l'acétylcholine estérase qui, en dégradant l'acétylcholine, arrête la contraction musculaire et permet au tissu musculaire de se relaxer, la dépolarisation membranaire par ajout d'excès de K^+ conduit à une contraction continue. Cette contraction continue a conduit parfois à la déchirure du sarcolemme des myotubes (**Figure 1.6, +80s**).

B. Lignées modèles de dystrophies musculaires :

B1. Modèle de dystrophie des ceintures de type 2B (dysferlinopathie) : lignée 578

B1.a. Taille, morphologie et capacité à fusionner

La lignée 578 a été établie à partir de myoblastes extraits par biopsie d'un triceps d'une patiente âgée de 25 ans et atteinte de dystrophie musculaire des ceintures de type 2B (LGMD2B de l'anglais « Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 2B »). La LGMD2B est une forme autosomale récessive de dystrophie musculaire des ceintures qui résulte de mutations dans le gène codant la dysferline, entraînant un défaut de réparation membranaire des cellules musculaires (Bansal et al. 2003).

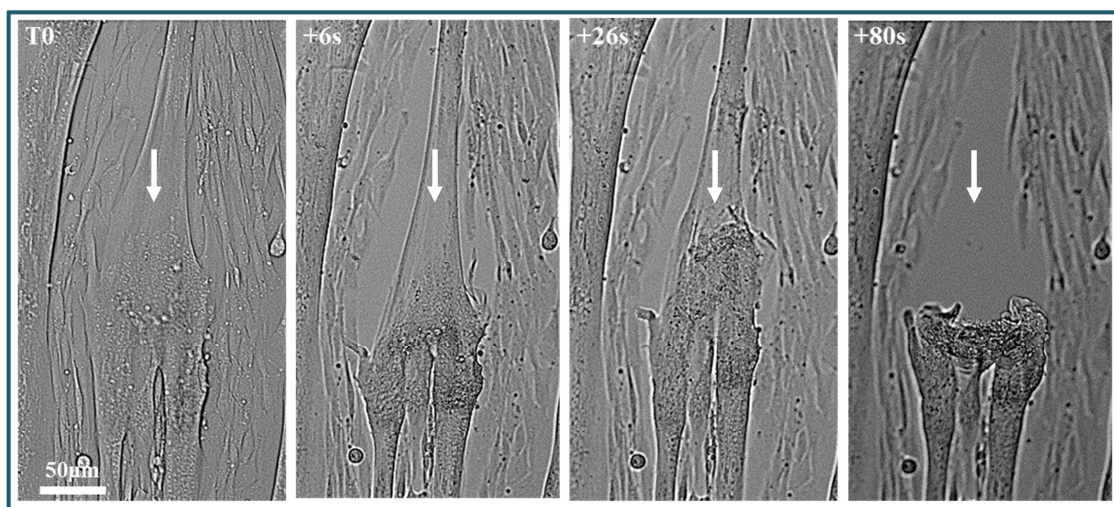


Figure 1.6 : Capacité de contraction des myotubes LHCN-M2. Des myotubes LHCN-M2 à J3 ont été placés dans un tampon de dépolarisation contenant 140mM KCl (T0) puis imagés toutes les 2s pendant 90s en microscopie à contraste interférentiel différentiel. La contraction du myotube au centre du champ (flèche blanche) débute dès les premières secondes après incubation en tampon de dépolarisation. Elle se poursuit jusqu'à déchirure de la cellule.

Nous avons tout d'abord analysé les principales caractéristiques morphologiques des myoblastes et myotubes de la lignée 578 et étudié la cinétique de formation des myotubes, afin de comparer ces paramètres à ceux mesurés pour la lignée LHCN-M2.

D'un point de vue morphologique, les myoblastes 578 ressemblent beaucoup aux myoblastes LHCN-M2 avec un aspect majoritairement fusiforme (**Figure 1.7A**). Ils ont, en moyenne, une longueur de 92 (+/-41) μm , une largeur de 42 (+/-12) μm pour une surface totale de 2721 (+/- 1620) μm^2 . Leur noyau occupe en moyenne 10,5 (+/-4.6) % de leur surface totale (**Tableau 1C**).

Caractéristiques morphologiques des myoblastes 578	
Longueur (μm)	92 (+/- 41)
Largeur (μm)	42 (+/- 12)
Surface totale (μm^2)	2721 (+/- 1620)
Surface nucléaire (μm^2)	240 (+/- 85)
Rapport nucléocytoplasmique (%)	10,5 (+/- 5)

Tableau 1C : Tableau récapitulatif des données morphologiques des myoblastes 578. Les myoblastes ont été cultivés et fixés comme indiqué dans la légende de la figure 1.7. Les données morphologiques correspondent aux moyennes déterminées en analysant un échantillon de 30 cellules, issues de 3 cultures différentes à des nombres de passages différents (10 cellules par culture, 2 champs aléatoires, 5 cellules par champ) à l'aide du logiciel ImageJ. Les données présentées entre parenthèses correspondent aux écart-types.

Résultats et conclusions

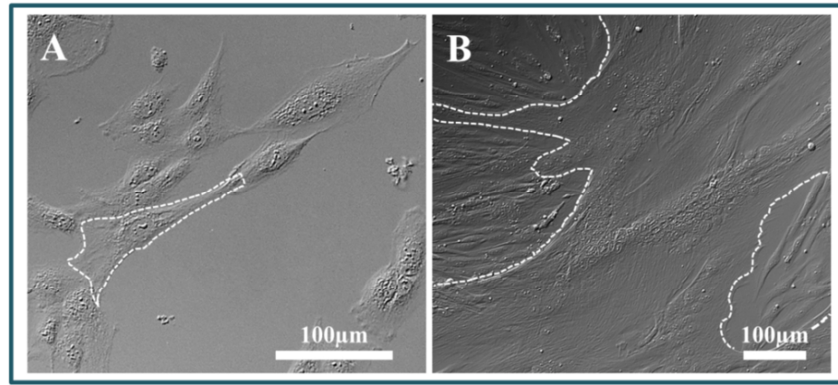


Figure 1.7 : Morphologie des myoblastes et myotubes de la lignée 578. Des myoblastes (A) en culture à une confluence de l'ordre de 50% et des myotubes (B), obtenus à partir de myoblastes à 80% de confluence cultivés pendant 3 jours (J3) en milieu de différenciation, ont été fixés avec du méthanol à -20°C pendant 5 min et observés en contraste interférentiel différentiel à l'aide du microscope Olympus IX-81. La membrane plasmique d'une cellule a été dessinée sous forme de pointillés blancs sur chaque image.

Nous avons ensuite analysé la cinétique de fusion des myoblastes 578 en myotubes. Des conditions expérimentales identiques à celles utilisées pour la lignée LHCN-M2 (**Figure 1.2**) ont été utilisées. L'induction de la différenciation est déclenchée en plaçant les myoblastes à 80% de confluence en milieu de différenciation. Néanmoins, contrairement aux myoblastes LHCN-M2, nous avons observé une différenciation en myocytes et la formation des premières cellules plurinucléées avant même l'ajout du milieu de différenciation (**Figure 1.8, J0**). Les myoblastes 578 semblent donc avoir la capacité de se différencier et fusionner en myotubes de façon spontanée, sous la seule influence de la densité cellulaire. Après 24 heures de culture en condition de différenciation, nous avons observé la formation de nombreux myotubes de petites tailles et d'aspect fusiformes, avec un indice de fusion de 25% (**Figure 1.8, J1**). A J2, nous avons observé la formation des premiers gros myotubes en forme d'étoile, avec un indice de fusion de l'ordre de 51% (**Figure 1.8, J2**). Nous avons observé que l'indice de fusion est maximal à J3 pour la lignée 578, atteignant une valeur de 72% (**Figure 1.8, J3**). Nous avons observé une baisse de l'indice de fusion à partir de quatre jours après induction de la différenciation (**Figure 1.8, J4**) et un décollement important des myotubes après sept jours (**Figure 1.8, J7**). Comme dans le cas de la lignée LHCN-M2, l'intervalle de temps permettant l'expérimentation sur les myotubes 578 est relativement limitée et s'étale sur une période allant de J3 à J6.

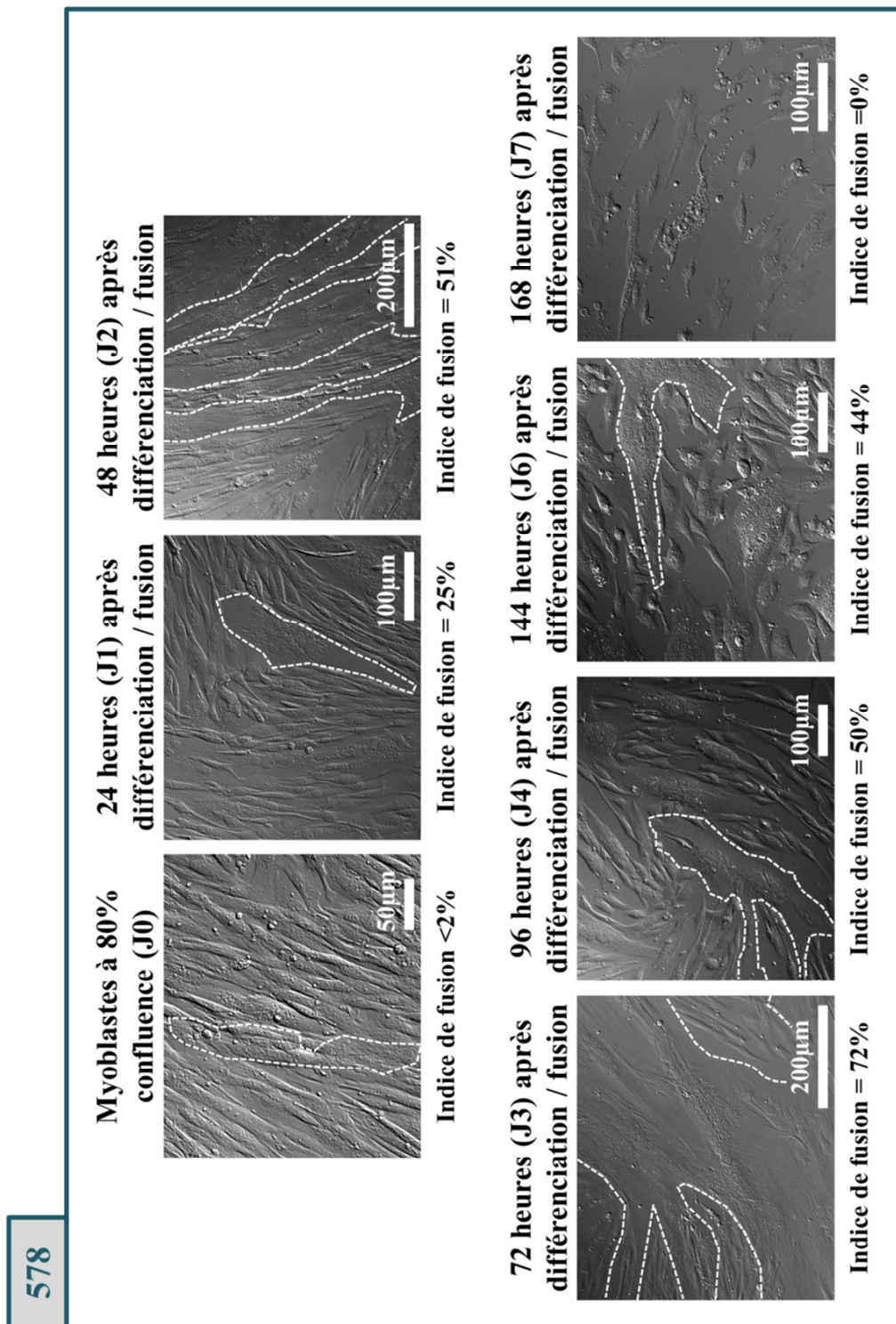


Figure 1.8 : Cinétique de formation des myotubes 578 par différenciation et fusion des myoblastes. Des myoblastes à 80% de confluence ont été fixés au méthanol à -20°C pendant 5 min (J0) ou incubés dans du milieu de différenciation et fixés après 24 heures (J1), 48 heures (J2), 72 heures (J3), 96 heures (J4), 144 heures (J6) et 168 heures (J7). Pour chaque condition, l'indice de fusion a été calculé en faisant le rapport du nombre de noyaux dans les myotubes sur le nombre total de noyaux pour 12 champs aléatoires dans 3 expériences indépendantes. Un allongement et alignement des cellules correspondant au stade myocyte ainsi que l'apparition des premières cellules plurinucléées sont observés dès J0, suggérant une différenciation/fusion spontanée des myoblastes. L'indice de fusion est maximal à J3.

Caractéristiques morphologiques des myotubes 578 à J3	
Longueur (mm)	0.3 à 2
Largeur (mm)	0.1 à 1
Surface totale (mm ²)	0.03 à 2
Nombre de noyaux par myotube	10 à 1000

Tableau 1D : Tableau récapitulatif des données morphologiques des myotubes 578 à J3.

Les myotubes ont été cultivés et fixés comme indiqués dans la légende de la **figure 1.7**. Les données morphologiques ont été estimées en analysant un échantillon de 30 cellules issues de 3 cultures différentes à des nombres de passages différents (10 cellules par culture, 2 champs aléatoires, 5 cellules par champ) à l'aide du logiciel ImageJ.

Les myotubes 578, comme les myotubes LHCN-M2, sont de très grandes cellules dont l'observation en totalité est impossible sur un seul champ, même au plus faible grossissement (6.3x). Les dimensions estimées pour ces myotubes sont identiques à celles estimées pour les myotubes LHCN-M2 (**Tableau 1D**).

B1.b. Organisation du cytosquelette et test de contractilité

Afin d'analyser l'organisation du cytosquelette des cellules 578, nous avons étudié la distribution subcellulaire de l'actine et de l'actinine- α dans les myoblastes et myotubes de cette lignée (**Figure 1.9**). Dans les myoblastes, l'actine fibreuse à une répartition éparse dans la cellule (**Figure 1.9A**), avec un réseau cortical dense (**Figure 1.9A, tête de flèche**). Comme observé pour les myoblastes de la lignée LHCN-M2, l'actinine- α est peu ou pas exprimée dans les myoblastes 578 (**Figure 1.9B**). Dans les myotubes à J3, nous avons observé que l'actine forme des longs filaments parallèles et orientés longitudinalement (**Figure 1.9C**). L'actinine- α forme également des faisceaux parallèles avec un marquage ponctué qui suggère qu'elle forme des motifs répétés, correspondant probablement aux stries Z (**Figure 1.9D**). La répartition de l'actine et de l'actinine- α dans les myotubes 578 est donc très similaire à ce que nous avons observé pour la lignée LHCN-M2. Afin de vérifier leur capacité à se contracter, des myotubes 578 ont été placés en tampon de dépolarisation dans des conditions identiques à celles utilisées pour les myotubes LHCN-M2.

Nous avons observé que les myotubes de la lignée 578 ont également la capacité de se contracter *in vitro*, la contraction a été observée dès les premières secondes après ajout du tampon de dépolarisation et s'est prolongée pendant plusieurs dizaines de secondes pour aboutir, parfois à la déchirure des myotubes (Figure non montrée).

578

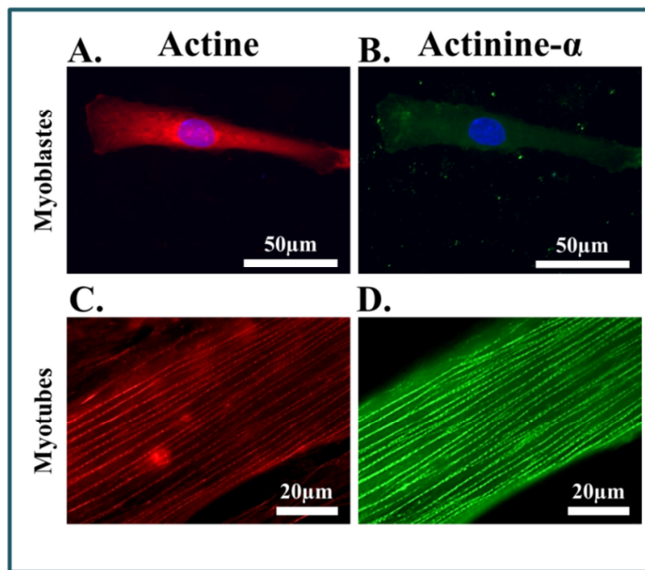


Figure 1.9 : Distribution subcellulaire de l'actine et actinine- α dans les myoblastes et myotubes 578. Des myoblastes (A et B) et des myotubes (C et D) de la lignée 578 ont été traités comme indiqué dans la légende de la figure 1.5. Dans les myotubes, les microfilaments d'actine (rouge) sont organisés en faisceaux parallèles ayant la même direction que les cellules, alors que dans les myoblastes leur agencement semble complètement désorganisé. L'actinine- α (vert), spécifiquement exprimée par les myotubes, s'organise sous forme de faisceaux alignés dans la même direction que la cellule. L'aspect ponctué du marquage de cette protéine suggère qu'elle est répartie en structures répétées, pouvant correspondre aux stries Z.

B1.c. Expression et distribution subcellulaire de la dysferline

Les LGMD2B résultent de mutations du gène de la dysferline (Rumaisa Bashir et al. 1998) (Bansal et al. 2003), qui conduisent à une déstabilisation de la structure protéique et une baisse de son expression. Les taux résiduels de dysferline sont néanmoins très variables d'un individu à l'autre (Illa et al. 2007).

Nous avons analysé par western blot, l'expression de la dysferline dans la lignée 578 en comparaison à la lignée contrôle LHCN-M2 (**Figure 1.10**). Contrairement à la lignée LHCN-M2, où nous avons observé sa présence en quantité similaire dans les myoblastes et les myotubes (**Figure 1.10, LHCN-M2**), la dysferline est indétectable dans les cellules de la lignée 578 (**Figure 1.10, 578**).

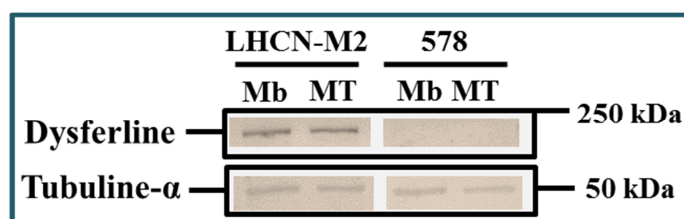


Figure 1.10 : Expression de la dysferline dans les myoblastes et myotubes des lignées LHCN-M2 et 578. 20 μ g d'extraits protéiques totaux issus de myoblastes (Mb) et de myotubes (MT) des lignées LHCN-M2 et 578 ont été séparés sur un gel SDS-PAGE 10% puis transférés sur une membrane de

PVDF. La dysferline (230kDa) et la tubuline- α (50kDa, témoin de charge) ont été détectés avec un anticorps monoclonal de souris anti-dysferline (NCL-Hamlet) et un anticorps monoclonal de souris anti-tubuline- α (Sigma) respectivement.

L'absence d'expression de la dysferline dans les myoblastes et myotubes 578 a été vérifiée par immunocytofluorescence (**Figure 1.11, 578**). Dans les myoblastes et myotubes LHCN-M2, le marquage de la dysferline est d'aspect ponctué avec une répartition large dans les

cellules, indiquant sa présence sous forme de clusters dans le cytoplasme et à la membrane plasmique (**Figure 1.11, LHCN-M2**).

Comme attendu (Philippi et al. 2012), les mutations du gène de la dysferline chez la patiente à partir de laquelle a été établie la lignée 578 conduisent à l'inhibition totale de l'expression de la dysferline.

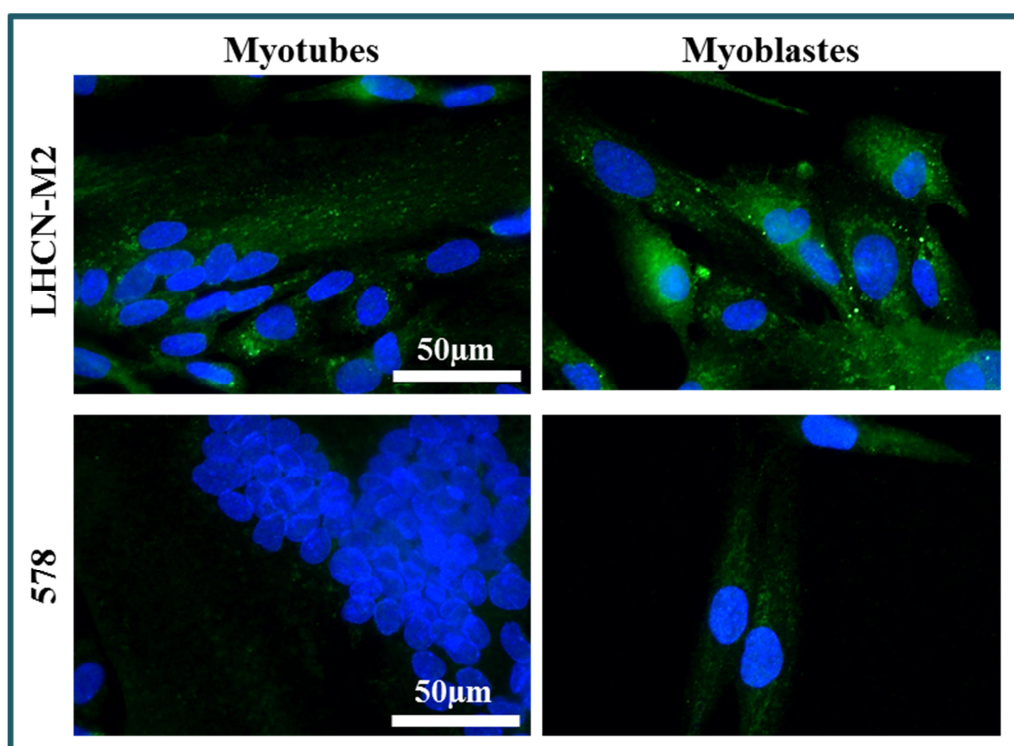


Figure 1.11 : Localisation subcellulaire de la dysferline dans les myoblastes et myotubes des lignées LHCN-M2 et 578. Les myoblastes et les myotubes à J3 ont été fixés avec du méthanol à -20°C pendant 5min puis immunomarqués pour la dysferline à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris et d'un anticorps secondaire de chèvre conjugué à l'Alexa-488 (vert). Un marquage au DAPI a été réalisé pour mettre en évidence les noyaux des cellules (bleu). La dysferline est répartie majoritairement sous forme d'agrégats dans les myoblastes et myotubes LHCN-M2. La dysferline est peu ou pas exprimée dans les cellules de la lignée 578.

B2. Modèle de dystrophie des ceintures de type 1C (cavéolinopathie) : lignée 650

B2.a. Taille, morphologie et capacité à fusionner

La lignée 650 a été générée à partir de myoblastes extraits du muscle *vastus lateralis* d'un homme âgé de 44 ans et atteint de LGMD1C, une forme autosomale dominante de dystrophie musculaire des ceintures résultant de mutations de la séquence codant la caveoline-3 (Minetti et al. 1998).

Les myoblastes de cette lignée sont des cellules mononuclées d'aspect majoritairement fusiforme (**Figure 1.12A**) ayant, en moyenne, une longueur de 96 (+/- 34)µm, une largeur de

Résultats et conclusions

47 μm (+/- 15 μm) pour une surface totale de 2651 (+/- 680) μm^2 (**Tableau 1E**). Leur noyau occupe en moyenne 11 (+/- 3,5)% de leur surface totale.

Caractéristiques morphologiques des myoblastes 650	
Longueur (μm)	96 (+/- 34)
Largeur (μm)	47 (+/- 15)
Surface totale (μm^2)	2651 (+/- 680)
Surface nucléaire moyenne (μm^2)	277 (+/- 71)
Rapport nucléocytoplasmique (%)	11 (+/- 3.5)

Tableau 1E : Tableau récapitulatif des données morphologiques des myoblastes 650. Les myoblastes ont été cultivés et fixés comme indiqué dans la légende de la figure 1.13. Les données morphologiques correspondent aux moyennes déterminées en analysant un échantillon de 30 cellules, issues de 3 cultures différentes à des nombres de passages différents (10 cellules par culture, 2 champs aléatoires, 5 cellules par champ) à l'aide du logiciel ImageJ. Les données présentées entre parenthèses correspondent aux écart-types.

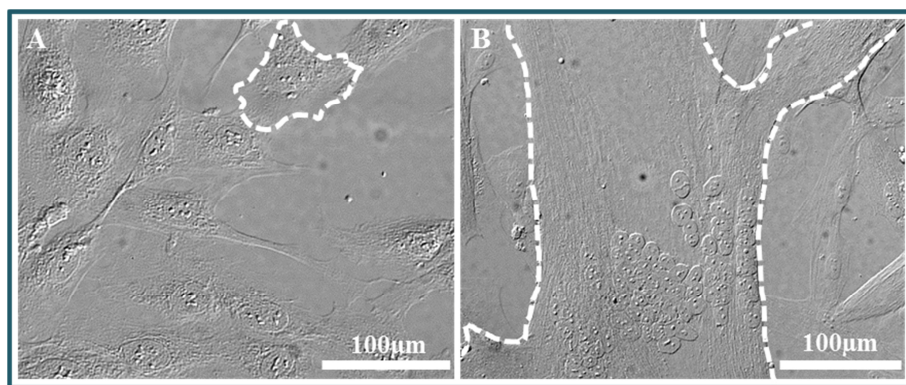


Figure 1.12 : Morphologie des myoblastes et myotubes de la lignée 650. Des myoblastes (A) en culture à une confluence de l'ordre de 50% et des myotubes (B), obtenus à partir de myoblastes à 80% de confluence cultivés pendant 3 jours (J3) en milieu de différenciation, ont été fixés avec du méthanol à -20°C pendant 5 min et observés en contraste interférentiel différentiel à l'aide du microscope OLYMPUS IX-81. La membrane plasmique d'une cellule a été dessinée sous forme de pointillés blancs sur chaque image.

La cinétique de formation de myotubes a été une nouvelle fois suivie en plaçant des myoblastes à une confluence de 80% en milieu de différenciation. Dans ces conditions les myoblastes apparaissent comme des cellules allongées, alignées dans une direction commune (**Figure 1.13, J0**). Contrairement à la lignée 578, aucun myotube n'est présent dans la culture avant passage en milieu de différenciation. 24 heures après induction de la différenciation/fusion, nous avons observé l'apparition de petites cellules plurinucléées, avec un indice de fusion inférieur à 5% (**Figure 1.13, J1**). La formation de myotubes d'une longueur de plusieurs centaines de μm est intervenue à partir de J2 (**Figure 1.13, J2**). Comme

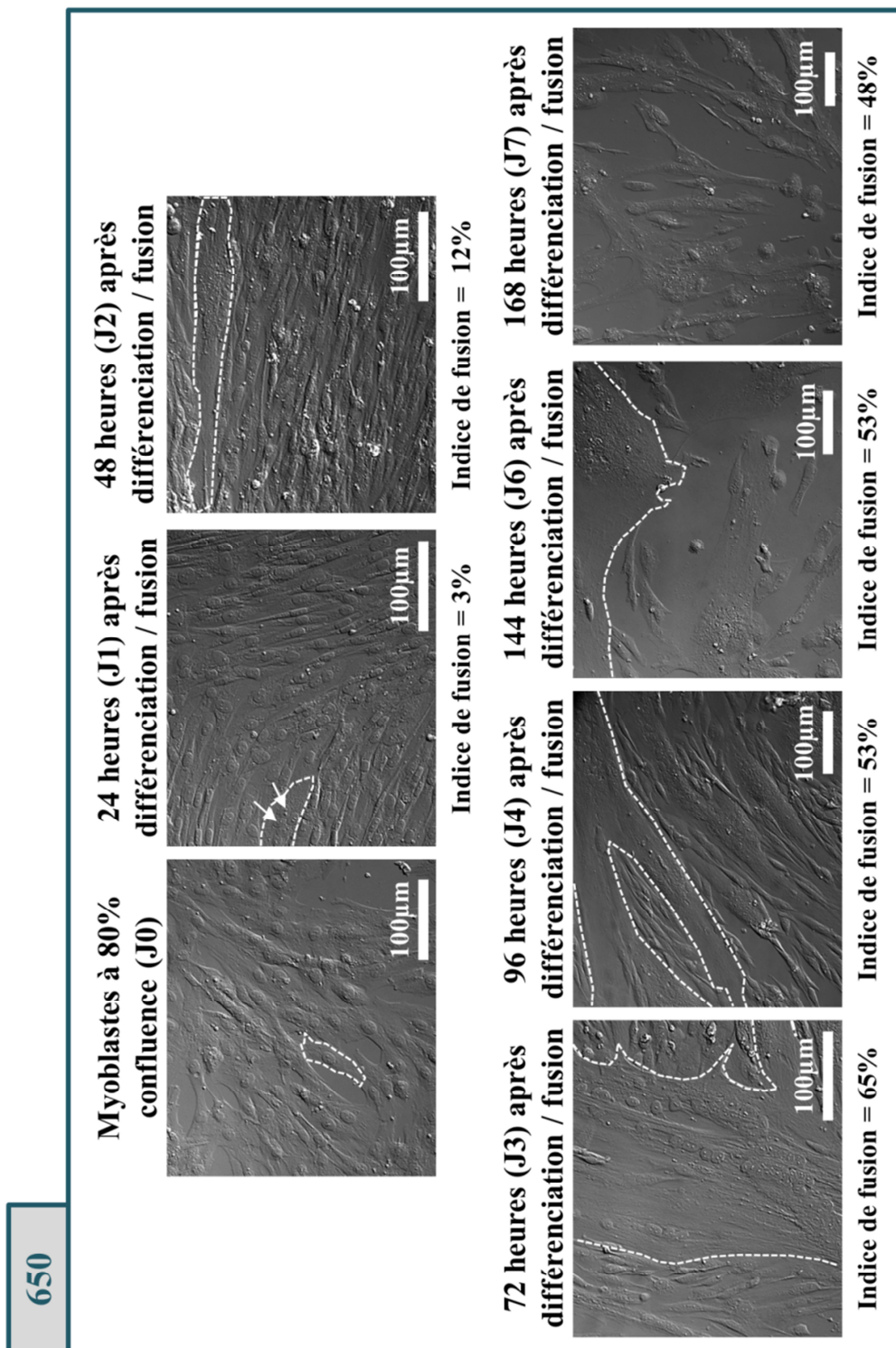


Figure 1.13 : Cinétique de formation des myotubes 650 par différenciation et fusion des myoblastes. Des myoblastes à 80% de confluence ont été fixés au méthanol à -20°C pendant 5 min (J0) ou incubés dans du milieu de différenciation et fixés après 24 heures (J1), 48 heures (J2), 72 heures (J3), 96 heures (J4), 144 heures (J6) et 168 heures (J7). Pour chaque condition, l'indice de fusion a été calculé en faisant le rapport du nombre de noyaux dans les myotubes sur le nombre total de noyaux, pour 12 champs aléatoires dans 3 expériences indépendantes. Un allongement et alignement des cellules correspondant au stade myocyte ainsi que l'apparition des premières cellules plurinucléées sont observés dès J0, suggérant une différenciation/fusion spontanée des myoblastes. L'indice de fusion est maximal à J3.

pour la lignée 578 nous avons observé que l'indice de fusion présente sa valeur maximale à J3, atteignant 65% (**Figure 1.13, J3**). Dès 96h après induction de la différenciation, nous avons observé une baisse de l'indice de fusion, résultant une fois encore du décollement des myotubes du support de culture. Nous avons ainsi montré que malgré la déficience en cavéoline-3, la capacité de différenciation/fusion des myoblastes 650 n'est pas affectée. La vitesse de fusion de cette lignée est même supérieure à celle évaluée pour la lignée saine LHCN-M2. L'intervalle de temps permettant l'expérimentation sur les myotubes 650 s'étale de J3 à J6, période sur laquelle l'indice de fusion est supérieur à 50%. Les myotubes 650 à J3 ont une morphologie (**Figure 1.12B**) et des dimensions tout à fait similaires au myotubes de la lignée LHCN-M2 (**Tableau 1F**).

Caractéristiques morphologiques myotubes 650 à J3	
Longueur (mm)	0.3 à 2
Largeur (mm)	0.1 à 1
Surface totale (mm ²)	0.03 à 2
Nombre de noyaux par myotube	10 à 1000

Tableau 1F : Tableau récapitulatif des données morphologiques des myotubes 650 à J3. Les myotubes ont été cultivés et fixés comme indiqués dans la légende de la figure 1.13. Les données morphologiques ont été estimées en analysant un échantillon de 30 cellules issues de 3 cultures différentes à des nombres de passages différents (10 cellules par culture, 2 champs aléatoires, 5 cellules par champ) à l'aide du logiciel ImageJ.

B2.b. Organisation du cytosquelette et test de contractilité

Concernant l'analyse de l'organisation de l'actine et l'actinine- α dans les myoblastes et myotubes nous avons observé pour les myoblastes une répartition éparse et multidirectionnelle de l'actine (**Figure 1.14A**) ainsi qu'une absence ou très faible expression de l'actinine- α (**Figure 1.14B**). Ces observations sont identiques à celles faites sur les lignées LHCN-M2 et 578.

Les myotubes ont un cytosquelette d'actine très organisé avec la présence de filaments parallèles orientés dans la même direction que la cellule (**Figure 1.14C**). Nous avons également observé une expression significative de l'actinine- α dans les myotubes à J3 avec une organisation similaire à l'actine et un marquage ponctué, suggérant que cette protéine y est organisée en structures répétées comme nous l'avons observé pour les deux autres lignées (**Figure 1.14D**).

Les tests de contraction sur les myotubes de la lignée 650 ont donné des résultats identiques à ce que nous avons observé pour les lignées LHCN-M2 et 578 (Figure non montrée).

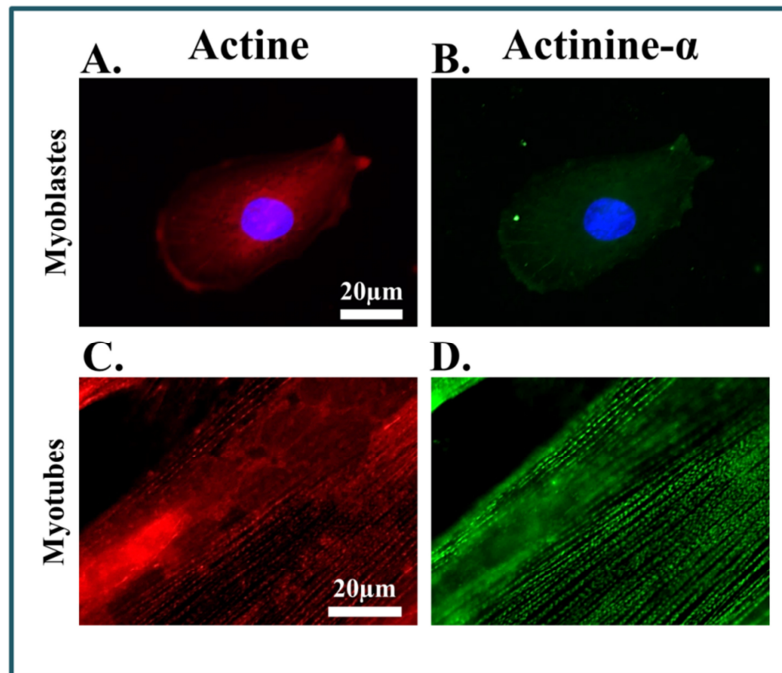


Figure 1.14 : Distribution de l'actine et de l'actinine- α dans les myoblastes et myotubes de la lignée 650. Des myoblastes (images du haut) et des myotubes (images du bas) de la lignée 650 ont été traités comme indiqué dans la légende de la figure 1.5. Dans les myotubes, les microfilaments d'actine (rouge) sont organisés en faisceaux parallèles ayant la même direction que les cellules, alors que dans les myoblastes leur agencement est désorganisé. L'actinine- α (vert), spécifiquement exprimée par les myotubes, s'organise sous forme de faisceaux alignés dans la même direction que la cellule. L'aspect ponctué du marquage de cette protéine suggère qu'elle est répartie en structures répétées, pouvant correspondre aux stries Z.

B2.c. Expression et distribution subcellulaire de la cavéoline-3

L'origine de la pathologie du patient, à partir duquel a été établie la lignée 650, est la substitution d'une guanine par une adénine dans le premier exon d'un allèle de la séquence codant la caveoline-3. Cette transition nucléotidique provoque un changement de l'acide aminé en position 27 (p.R27>Q) dans la séquence protéique. Afin d'évaluer les conséquences potentielles de cette mutation, nous avons analysé, par western blot, l'expression de la cavéoline-3 dans les myoblastes et myotubes de la lignée 650, en comparaison à la lignée LHCN-M2 (**Figure 1.15**). La cavéoline-3 est indétectable dans les myoblastes des deux lignées (**Figure 1.15, Mb**), en accord avec les observations faites pour des cellules primaires et lignées murines, (Volonte, Peoples, et Galbiati 2003), (Parton et al. 1997), (Song et al. 1996). La cavéoline-3 a été détectée dans les extraits protéiques de myotubes de la lignée saine LHCN-M2 (**Figure 1.15, LHCN-M2, MT**), mais pas dans ceux des myotubes de la lignée 650 (**Figure 1.15, 650, MT**). La cavéoline-3 est donc peu, ou pas, exprimée dans les myotubes 650.

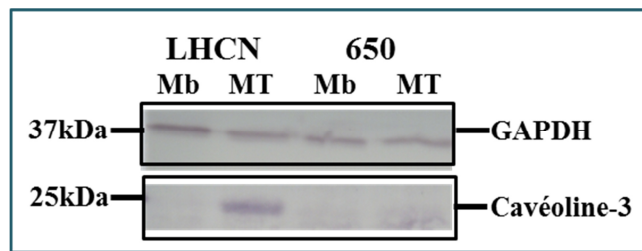


Figure 1.15 : Expression de la cavéoline-3 dans les myoblastes et myotubes des lignées LHCN-M2 et 650. 40µg d'extraits protéiques totaux issus de myoblastes (Mb) et de myotubes (MT) des lignées LHCN-M2 et 650 ont été séparés sur un gel SDS-PAGE 10% puis transférés sur une membrane de PVDF. La cavéoline-3 (22kDa environ) et la GAPDH (37kDa, témoin de charge) ont été détectés avec un anticorps monoclonal de souris anti-cavéoline-3 (Santa-Cruz) et un anticorps polyclonal de lapin anti-GAPDH (Santa-Cruz) respectivement.

La présence et la distribution subcellulaire de la cavéoline-3 ont ensuite été analysées par immunocytofluorescence dans les cellules LHCN-M2 et 650 (**Figure 1.16**). Les résultats confirment l'absence de cavéoline-3 dans les myoblastes des deux lignées. En immunocytofluorescence, la cavéoline-3 est détectée dans les myotubes 650 (**Figure 1.16, 650, myotubes**). Bien qu'en concentration faible, la cavéoline-3 est donc exprimée par les myotubes 650. Nous avons néanmoins constaté que sa distribution subcellulaire dans les myotubes de la lignée 650 diffère de celle observée dans la lignée LHCN-M2. Alors que la cavéoline-3 apparaît selon une distribution ponctiforme dans les myotubes LHCN-M2, dans le cytoplasme et à la membrane (**Figure 1.16, LHCN-M2, flèches blanches**), le marquage dans les myotubes 650 montre qu'une faible partie de la cavéoline-3 est présente dans le sarcolemme, mais que la majeure partie s'accumule dans des structures filamenteuses de plusieurs µm de long (**Figure 1.16, 650, flèches blanches**). Il a précédemment été montré que la mutation R27>Q pouvait conduire à une rétention de la cavéoline-3 dans l'appareil de Golgi (Federica Sotgia et al. 2003). Nous avons réalisé un co-immunomarquage de la cavéoline-3 et de la protéine GOSR1, un marqueur des saccules golgiennes. Nous n'avons pas observé de co-localisation entre ces deux protéines (résultat non montré), ce qui indique que cette forme mutée de cavéoline-3 se trouve probablement séquestrée dans la membrane d'un autre compartiment. D'autres compartiments cellulaires, tel que le réticulum endoplasmique, devront être analysés.

Par ailleurs, la présence de la cavéoline-3 dans certains myoblastes, en condition de différenciation (**Figure 1.16, flèche rouge**), confirme que l'expression de cette protéine est initiée lors de la différenciation.

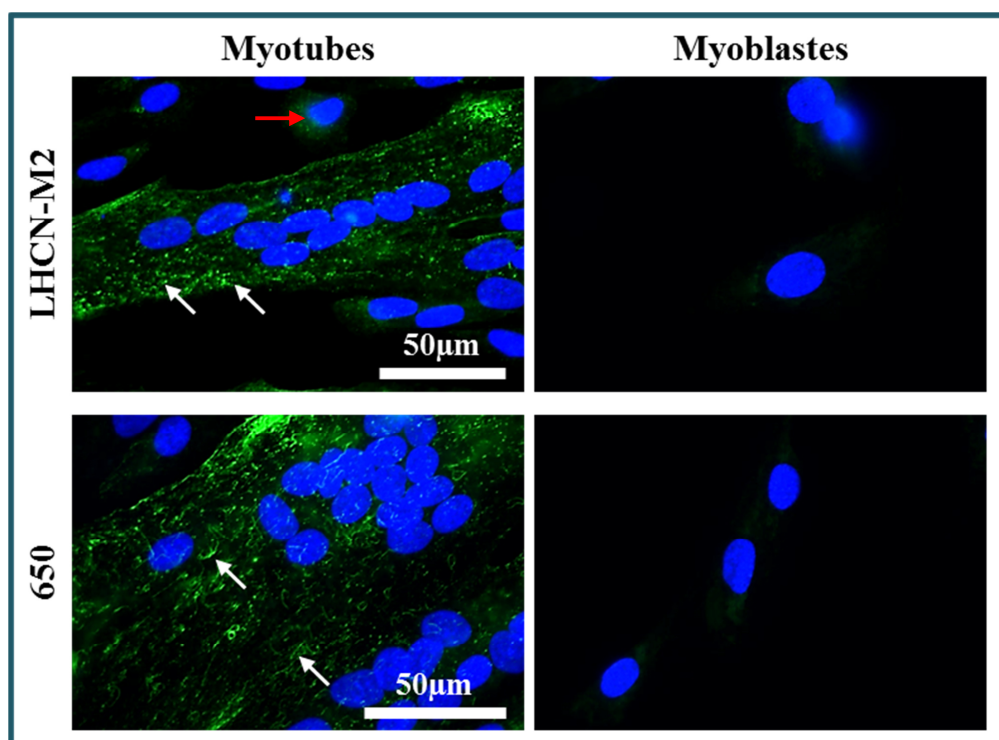


Figure 1.16 : Localisation subcellulaire de la cavéoline-3 dans les myoblastes et myotubes des lignées LHCN-M2 et 650. Des myoblastes et des myotubes à J3 des lignées LHCN-M2 et 650 ont été fixés avec du méthanol à -20°C pendant 5min puis immunomarqués pour la cavéoline-3 à l'aide d'un anticorps primaire monoclonal de souris dirigé et d'un anticorps secondaire de chèvre conjugué à l'Alexa-488 (vert). Un marquage au DAPI a été réalisé pour mettre en évidence les noyaux des cellules (bleu). La cavéoline-3 n'est pas exprimée dans les myoblastes en condition de culture des deux lignées. Elle est présente dans les myoblastes en condition de différenciation (**flèche rouge**) suggérant que son expression est déclenchée durant la différenciation des myoblastes. Elle est fortement exprimée dans les myotubes des deux lignées. Dans les myotubes de la lignée LHCN-M2, la cavéoline-3 est répartie en petits amas à la membrane plasmique et dans le cytoplasme (**flèches blanches**). Dans les myotubes 650, elle apparaît sous forme de petits filaments, suggérant une localisation et/ou une organisation différente de celle observée dans les myotubes LHCN-M2 (**flèches blanches**).

C. Conclusion :

Les caractéristiques morphologiques des myoblastes (**Tableau 1G**) et des myotubes (**Tableau 1H**) des trois lignées étudiées sont résumées ci-dessous.

Les myoblastes de la lignée saine LHCN-M2 et des lignées pathologiques 650 et 578 ont une morphologie très similaire, avec un aspect majoritairement fusiforme. Nous avons néanmoins observé que les myoblastes des lignées pathologiques sont plus larges que les myoblastes de la lignée saine LHCN-M2, respectivement de 20% et 30% pour les lignées 578 et 650 (**Tableau 1G**). La longueur des myoblastes des trois lignées ne variant pas, la surface totale occupée par les myoblastes des lignées pathologiques est en conséquence plus importante que celle de la lignée saine.

Résultats et conclusions

Myoblastes			
Nom de la lignée	LHCN-M2	578	650
Longueur (µm)	93,5 +/-31,4	91,8 +/-40,6	96,1 +/-34
Largeur (µm)	35 +/-11,9	41,9* +/-11,9	47** +/-14,8
Surface totale (µm ²)	2001,2 +/-678,4	2721,4** +/-1620	2651,2** +/-680
Surface nucléaire (µm ²)	245 +/-68	240 +/-85	277 +/-71
Rapport nucléocytoplasmique (%)	12,9 +/-3,1	10,5* +/-4,6	11,1* +/-3,5

Tableau 1G : Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques des myoblastes pour les lignées LHCN-M2, 578 et 650. Les données indiquées sont issues des tableaux 1A (LHCN-M2), 1C (578) et 1E (650). Les dimensions mesurées pour les lignées pathologiques 578 et 650 ont été comparées à celles mesurées pour la lignée saine LHCN-M2 à l'aide d'un test de Student. La significativité des différences est indiquée selon les valeurs de probabilité p suivante : * pour 0.05 > p > 0.01, ** pour 0.01 > p > 0.001, *** pour 0.001 > p.

Myotubes			
Nom de la lignée	LHCN-M2	578	650
Longueur (mm)	0.3 à 2	0.3 à 2	0.3 à 2
Largeur (mm)	0.1 à 1	0.1 à 1	0.1 à 1
Surface totale (mm ²)	0.03 à 2	0.03 à 2	0.03 à 2
Nombre de noyaux	10 à 1000	10 à 1000	10 à 1000
Indice de fusion à J2	2%	51%	12%
Indice de fusion à J3	62%	72%	65%
Indice de fusion à J4	68%	50%	53%

Tableau 1H : Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques des myotubes pour les lignées LHCN-M2, 578 et 650. Les dimensions morphologiques indiquées sont issues des tableaux 1B (LHCN-M2), 1D (578) et 1F (650). Les indices de fusion indiqués sont issus des figures 1.2 (LHCN-M2), 1.8 (578) et 1.14 (650).

L'augmentation du rapport nucléocytoplasmique est un critère de diagnostic pour de nombreuses pathologies, comme certaines formes de dysplasies et de cancers (Zink, Fischer, et Nickerson 2004). Il résulte le plus souvent d'une augmentation importante de la taille des noyaux. Dans le cas de certaines dystrophies musculaires, comme la dystrophie de Duchenne, il a été montré que les cellules satellites ont un noyau plus grand, de l'ordre de 40%, en comparaison aux cellules saines (Watkins et Cullen 1988). Les rapports nucléocytoplasmiques des myoblastes des lignées pathologiques 578 et 650 sont inférieurs à celui des myoblastes de la lignée LHCN-M2 (**Tableau 1G**). Ces variations s'expliquent uniquement par la différence de surface totale entre les cellules pathologiques et les cellules saines, la surface nucléaire étant inchangée quelle que soit la lignée. L'état pathologique associé aux myoblastes 650 et 578 ne semble pas être associé à une morphologie nucléaire originale. La morphologie nucléaire est donc un mauvais critère diagnostic pour les LGMD2B et 1C.

Le suivi cinétique de la formation des myotubes LHCN-M2 montre que l'indice de fusion est supérieur à 50% de J3 à J6, période adaptée pour l'expérimentation sur ces cellules, avec un

indice maximal à J4 (**Tableau 1H**). Les myotubes caractérisés à J3 ont des dimensions morphologiques énormes, incomparables avec les valeurs observées sur des modèles murins ou de rat. Ces dimensions extrêmes ont rendu impossible l'observation sur un champ unique, même en microscopie à faible grossissement, de myotube en entier. Les mesures réalisées ont par conséquent été très approximatives.

Nous avons observé que les cellules de la lignée 578, au stade myoblaste ainsi qu'au stade myotube, n'expriment pas la dysferline, comme attendu (Philippi et al. 2012). Alors que la déficience en dysferline retarde fortement la différenciation myogénique des myoblastes murins (Belanto et al. 2010), nous avons observé que les myoblastes 578, totalement dépourvus de dysferline, conservent la capacité de se différencier et de fusionner en myotubes, avec une cinétique plus rapide comparée aux cellules LHCN-M2. La dysferline ne semble donc pas jouer de rôle dans la fusion myoblaste-myoblaste au niveau du muscle strié squelettique humain. Les indices de fusion mesurés sont supérieurs à 50% entre J2 et J4, avec un maximum de 72% atteint à J3 (**Tableau 1H**). Le fait que les myoblastes 578 ont la capacité de fusionner spontanément, en absence d'induction, et le fait que leur cinétique de formation de myotubes est plus rapide, suggèrent même que la dysferline pourrait jouer un rôle de régulateur négatif de la fusion myoblaste-myoblaste. Il serait intéressant d'étendre cette étude à plusieurs lignées provenant d'autres patients atteints de LGMD2B avec la même mutation et des mutations différentes, ainsi que plusieurs lignées provenant de patients sains pour confirmer cette hypothèse, ou vérifier que ce ne soit pas un phénomène associé à un contexte génétique particulier du patient dont a été générée la lignée 578.

A ce jour, de nombreuses mutations du gène codant la cavéoline-3 ont été identifiées comme responsable du développement de la pathologie LGMD1C (Gazzerro et al. 2010). Les myoblastes de la lignée 650 ont été établis à partir de patients porteur de la mutation p.R27Q (Timmel et al. 2015). C'est une des mutations de la cavéoline-3 les plus décrites dans la littérature. Le taux d'expression de la cavéoline-3 chez les patients atteints de LGMD1C est très variable en fonction du type de mutation, mais également en fonction de l'individu pour une même mutation ((Minetti et al. 1998), (Carbone et al. 2000), (Timmel et al. 2015)).

Nous avons étudié par western-blot et immunocytofluorescence le taux d'expression et la distribution subcellulaire de la cavéoline-3 dans les myoblastes et myotubes des lignées LHCN-M2 et 650. Nous avons d'abord observé, par les deux approches, que la cavéoline-3 n'est pas exprimée dans les myoblastes des deux lignées. Ce résultat est en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature pour les cellules musculaires murines, pour lesquelles l'expression de la cavéoline-3 est initiée lors du processus myogénique. L'observation d'un marquage positif de la cavéoline-3, dans certains des myoblastes en condition de différenciation, renforce ce résultat et suggère que l'expression de la cavéoline-3 est initiée à un stade précoce de la différenciation. Dans les myotubes 650, la cavéoline-3 a été détectée par immunocytofluorescence, mais pas par western-blot, indiquant une très faible expression. Nous avons observé un profil de marquage très différent entre les lignées LHCN-M2 et 650. Dans les myotubes LHCN-M2, la distribution de la cavéoline-3 est ponctiforme et répartie à

la fois dans le cytoplasme et dans le sarcolemme. Dans le cas des myotubes 650, la cavéoline-3 forme des fibres de plusieurs μm de long dont la majorité semble être cytoplasmique. Comme il a été décrit que le mutant p.R27Q de la cavéoline-3, pour des systèmes d'expression hétérologues, s'accumule au niveau de la membrane des saccules golgiennes, nous avons co-immunomarcué la cavéoline-3 avec une protéine spécifique du compartiment golgien. Nous n'avons pas observé de co-localisation de ces deux protéines, indiquant que la cavéoline-3 est séquestrée dans une autre structure. En connaissance de la voie de biosynthèse de la cavéoline-3, le réticulum endoplasmique nous semble être un bon candidat.

Contrairement à la lignée musculaire murine C2C12, où la diminution de l'expression de la cavéoline-3 inhibe la fusion des myoblastes (Ferruccio Galbiati et al. 1999), les myoblastes 650 conservent une capacité à fusionner pour former des myotubes. Leur cinétique de fusion est supérieure aux myoblastes sains LHCN-M2, mais cette différence est moins prononcée que celle déterminée entre la lignée 578 et la lignée LHCN-M2. Nos observations indiquent que la cavéoline-3 ne semble pas jouer de rôle majeur dans la myogénèse du muscle strié squelettique humain, contrairement à ce qui a été décrit pour la lignée murine C2C12.

Nous avons enfin observé que les myotubes à J3, pour les trois lignées étudiées, via l'analyse de la structuration et de la fonctionnalité de leur cytosquelette contractile, ont une maturation myogénique se rapprochant des fibres musculaires physiologiques. Sauf lorsque mentionné, l'ensemble des expériences portant sur l'étude de la réparation membranaire a été réalisé sur des myotubes à J3.

Chapitre n°2 : Capacité de réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines saines et pathologiques

Les fibres musculaires striées squelettiques, par leur déformation durant la contraction, subissent des contraintes mécaniques considérables pouvant conduire à une rupture de leur sarcolemme (P. L. McNeil et Khakee 1992). Cette rupture entraîne une élévation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire qui peut conduire à la mort de la cellule si elle n'est pas réparée rapidement (B. P. Morgan, Luzio, et Campbell 1986). L'incapacité de réparer ces ruptures membranaires est à l'origine de certaines dystrophies musculaires telles que la dystrophie musculaire des ceintures de type 2B et la myopathie de Myoshi (Bansal et al. 2003).

Les ruptures mécaniques ne sont cependant pas les seuls dommages que peut subir le sarcolemme. La membrane plasmique, tout type cellulaire confondu, peut être endommagée par l'insertion dans la bicouche lipidique de différents produits : toxines de bactéries pathogènes, protéines de lymphocytes T cytotoxiques et « natural killer » ou encore complexe d'attaque membranaire du système du complément. Des différences majeures existent entre les ruptures mécaniques et des perforations engendrées par l'insertion de protéines dans la membrane plasmique :

- La taille d'une rupture mécanique (quelques μm) est bien plus grande que la taille d'un pore dont le diamètre excède rarement 30nm. Une taille plus grande implique des échanges plus importants entre les milieux extracellulaire et intracellulaire, avec notamment une exposition plus forte du contenu cytosolique aux composés oxydants.
- La rupture mécanique de la membrane plasmique entraîne l'exposition des domaines hydrophobes des phospholipides membranaires.
- Les phosphatidylsérines (PS), majoritairement présentes sur le feuillet interne de la membrane plasmique, sont exposées aux facteurs pro-coagulants dans le cas d'une rupture mécanique.
- La rupture mécanique est associée à des dégâts collatéraux comme l'altération du cytosquelette cortical.
- A l'échelle d'une cellule, les dommages engendrés par l'insertion de protéines dans la membrane plasmique sont le plus souvent multiples.

Parmi les différents mécanismes de réparation proposés, il faut noter que le modèle du « patch lipidique » a été soumis sur la base d'expériences de rupture mécanique de la membrane plasmique (Cooper et McNeil 2015) alors que les mécanismes de réparation par endocytose ou bourgeonnement membranaire ont été proposés suite à des études de perforation de la membrane plasmique par des toxines bactériennes (Draeger et al. 2014). Cela suggère que l'ensemble de ces mécanismes pourraient coexister dans une même cellule, leur mise en place dépendant du type de dommage et/ou du type cellulaire. Cette question majeure reste néanmoins posée.

Plusieurs méthodes pour endommager la membrane plasmique des cellules eucaryotes *in vitro* existent :

- Des méthodes chimiques par l'utilisation de détergents (Triton X-100, saponine,...). Ces molécules s'insèrent dans la bicouche lipidique et déstabilisent la structure de la membrane plasmique.
- Des méthodes biochimiques par utilisation de toxines bactériennes formant des pores dans la membrane plasmique. De nombreuses bactéries produisent ce type de toxines afin d'introduire dans des cellules cibles des facteurs de virulence ou de lutter contre des cellules du système immunitaire. A titre d'exemple, au début des années 2000, parmi les 325 toxines bactériennes identifiées, 115 étaient des toxines endommageant les membranes (Alouf 2001). La streptolysine O (SLO) est aujourd'hui l'une des toxines les plus utilisées, notamment pour perméabiliser les cellules vivantes (Walev et al. 2001) dans le but de délivrer dans les cellules du matériel extracellulaire d'intérêt (plasmides, protéines,...).
- Des méthodes physiques comme le scraping (grattage mécanique des cellules), le beatbeating (utilisation de petites billes pour déformer la membrane jusqu'à rupture), la perforation avec une aiguille ou encore l'irradiation laser. Parmi toutes ces méthodes, seule l'irradiation laser et la perforation par une aiguille permettent de créer une rupture membranaire unique sur une seule cellule à la fois.

Pour avoir un regard assez étendu sur le(s) mécanisme(s) de réparation membranaire qui peu(ven)t se mettre en place au niveau du sarcolemme, nous avons expérimenté deux types de dommages : la rupture mécanique et la perméabilisation par insertion de toxine bactérienne.

Pour les expériences de rupture mécanique, notre choix s'est porté vers l'irradiation laser qui offre la possibilité de créer des dommages de manière plus contrôlée et reproductible que les autres méthodes mécaniques. Pour créer des pores dans le sarcolemme des cellules musculaires striées squelettiques humaines, nous avons utilisé une des toxines bactériennes les plus employées en recherche qui est la SLO. Cette toxine, monomérique sous forme soluble, polymérise dans les membranes lipidiques contenant du cholestérol et génère des pores de 30nm de diamètre environ (Keyel et al. 2013). Nous avons testé à l'aide de ces deux approches la capacité de chacune des lignées, aux stades myoblaste et myotube, à réparer des lésions de leur sarcolemme.

A. Rupture mécanique par irradiation laser

A1. Approche expérimentale

Afin de créer une rupture de la membrane plasmique, les myoblastes et les myotubes ont été irradiés à l'aide d'un laser dans le proche infrarouge (820nm) couplé à un microscope confocal en présence de FM1-43. Le FM1-43 est une sonde fluorescente styrylée qui s'insère dans les bicouches lipidiques sans avoir la capacité de les traverser totalement. Une fois inséré dans la membrane, sous l'influence de l'environnement membranaire hydrophobe, l'intensité

de fluorescence du FM1-43 augmente (Bolte et al. 2004). Seule la membrane plasmique apparaît fluorescente pour une cellule intacte (**Figure 2.1, -1.6s**). L'irradiation de la membrane plasmique provoque sa rupture et l'entrée de FM1-43 dans la cellule lésée. Une fois dans la cellule, le FM1-43 s'insère dans le réseau membranaire intracellulaire conduisant à une augmentation de l'intensité de fluorescence intracellulaire au cours du temps (**Figure 2.1, +1.6s, B et C**).

La rupture de la membrane plasmique a été réalisée en scannant à trois reprises une région de 1 μm de côté (**Figure 2.1, -1.6s, carré blanc**) à l'aide d'un microscope confocal à balayage. Afin de sélectionner les conditions optimales pour l'étude des cellules musculaires striées squelettiques humaines, nous avons réalisé des irradiations laser à des puissances comprises entre 60 et 200mW (**Figure 2.1**).

Pour une puissance réglée à 200mW à l'entrée du microscope, nous avons observé que l'irradiation conduisait à un échauffement très important de la zone scannée, induisant l'apparition d'une bulle et créant un dommage catastrophique de la membrane plasmique (**Figure 2.1A**). Pour une puissance de 160mW, cet échauffement de la zone irradiée ne s'est plus produit (**Figure 2.1B**). A cette puissance, la rupture engendrée s'étend sur plusieurs μm , conduisant à une entrée massive et rapide de Ca^{2+} dans la cellule et induisant, le plus souvent, la contraction des myotubes et leur déchirure (**Figure 2.1B, médailles**). A 110mW, la taille de la rupture du sarcolemme est d'environ 1 μm (**Figure 2.1C, +1.6s**). Elle conduit à une entrée immédiate de FM1-43 dans la cellule. Pour des puissances inférieures à 110mW, nous avons observé la présence de rupture de la membrane plasmique de façon très aléatoire. Nous avons observé qu'à 60mW et pour des puissances inférieures, l'irradiation laser n'avait aucun effet sur la membrane (**Figure 2.1D**). Une irradiation avec un laser d'une longueur d'onde de 820nm, réglé à une puissance de 110mW, a donc été retenue pour l'étude de la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines.

Afin de s'assurer de la reproductibilité des dommages réalisés, la région membranaire irradiée a systématiquement été imagée (**Figure 2.2**). L'image du premier scan a permis de vérifier le positionnement de la zone sélectionnée, la membrane plasmique devant être parfaitement centrée dans le champ (**Figure 2.2, scan 1**). Le réglage optimal de la focalisation du laser sur la membrane s'est traduit par l'observation systématique du photoblanchiment du FM1-43 (**Figure 2.2, scan 2**). Le laser émettant des rayonnements de longueurs d'onde centrées sur 820nm et le FM1-43 présentant un maximum d'absorption autour de 490nm, l'excitation du fluorophore n'est possible qu'après absorption quasi-simultanée de deux photons, selon un mode bi-photonique. Dans ces conditions, le photoblanchiment du fluorophore ne peut être réalisé que pour une parfaite focalisation du laser.

Nous avons enfin vérifié systématiquement l'apparition d'une petite bulle d'un diamètre d'environ 200nm, traduisant un échauffement localisé de la membrane et conduisant à sa rupture (**Figure 2.2, scan 3**). Sur ce troisième balayage, nous avons observé un retour de fluorescence du FM1-43, consécutif à son entrée dans la cellule par la zone endommagée. Toutes les expériences ne répondant pas à ces critères d'irradiation ont été systématiquement rejetées de l'analyse.

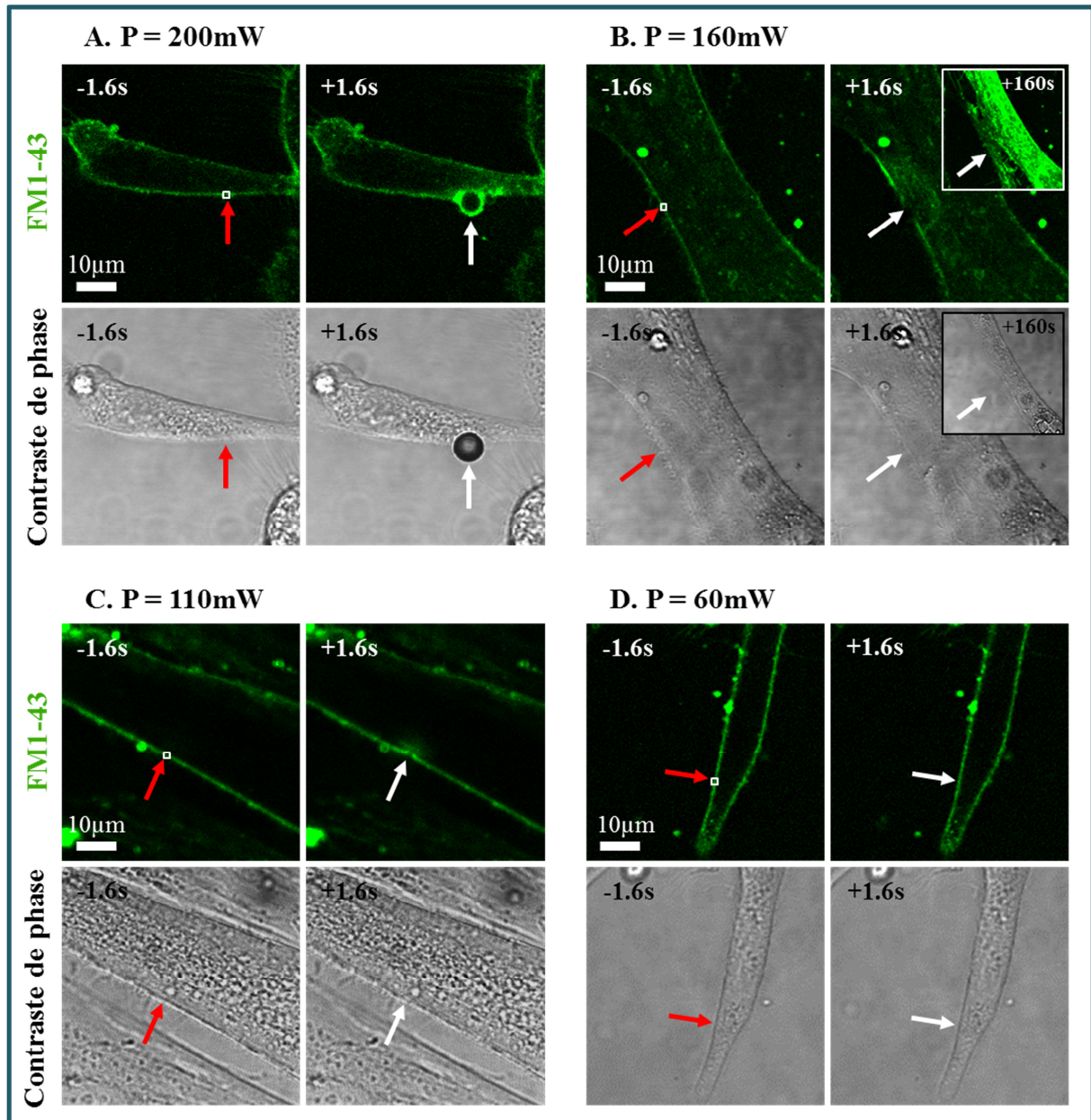


Figure 2.1 : Influence de la puissance laser sur le dommage membranaire lors d'une irradiation du sarcolemme. Les cellules ont été irradiées sur une région de $1\mu\text{m}$ de côté (carré blanc) à l'aide d'un microscope confocal à balayage. Afin de sélectionner les conditions optimales, les cellules musculaires striées squelettiques humaines ont été irradiées avec un laser d'une puissance de 200mW (A), 160mW (B), 110mW (C) et 60mW (D), en présence de $5\mu\text{g/mL}$ de FM1-43 (vert). La longueur d'onde du laser a été fixée à 820 nm. Les puissances du laser ont été mesurées à l'entrée du microscope. Dans toutes les images, la zone irradiée est indiquée avec une flèche rouge avant irradiation et une flèche blanche après irradiation. Les temps indiqués correspondent au temps en secondes avant (-) et après (+) irradiation respectivement. La puissance de 110mW, qui crée un dommage modéré, a été retenue pour nos expériences d'irradiation.

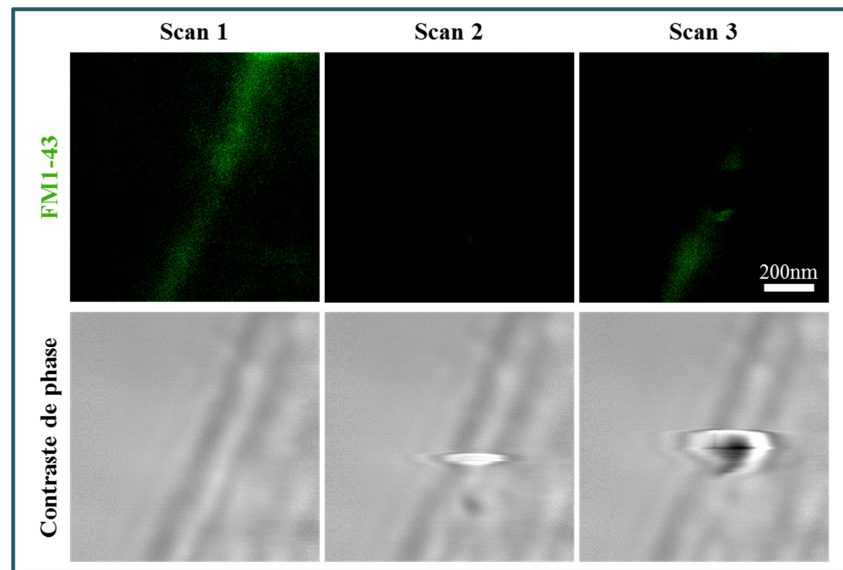


Figure 2.2 : Evènement de rupture du sarcolemme durant l'irradiation laser. La rupture de la membrane plasmique a été réalisée en scannant à trois reprises une région de 1 μm de côté à l'aide d'un microscope confocal à balayage en présence de FM1-43 (vert). Scan 1 : la membrane plasmique doit être parfaitement centrée dans le champ. Scan 2 : le photoblanchiment du FM1-43 assure une focalisation optimale du laser. Scan 3 : l'apparition d'une petite bulle traduit un échauffement localisé.

Le suivi cinétique de l'entrée du FM1-43 dans les cellules a été utilisé pour l'analyse de la réparation membranaire. En absence de réparation de la membrane plasmique le FM1-43 pénètre en continu dans la cellule conduisant à une augmentation massive et continue de la fluorescence intracellulaire. Au contraire, le colmatage de la rupture stoppe l'entrée de FM1-43 dans la cellule ce qui stabilise l'intensité de fluorescence intracellulaire au cours du temps. La représentation graphique d'un évènement de réparation de la membrane plasmique donne alors une courbe caractérisée par la présence d'un plateau. Le suivi cinétique de l'intensité de fluorescence intracellulaire renseigne donc sur la capacité de réparation d'une cellule.

A2. Cas de la lignée LHCN-M2

La capacité de réparation des myoblastes et des myotubes LHCN-M2 a d'abord été testée. Les cellules ont été incubées dans du tampon contenant 1mM Ca^{2+} et 5 $\mu\text{g/ml}$ de FM1-43 et irradiées selon les paramètres décrits ci-dessus.

Pour les myoblastes, nous avons observé une entrée de FM1-43 dès les premières secondes après irradiation de la membrane plasmique, comme le montre l'augmentation locale de l'intensité de fluorescence à l'endroit de l'irradiation (**Figure 2.3, myoblaste, +1.6s, flèche blanche**). Cette entrée de FM1-43 traduit la présence d'une rupture de la membrane plasmique. 160 secondes après l'irradiation, nous avons observé une intensité de fluorescence intracellulaire importante dans l'ensemble des myoblastes LHCN-M2 endommagés, résultant d'une entrée massive de FM1-43 (**Figure 2.3, myoblaste, +160s**). L'analyse de l'évolution de

l'intensité de fluorescence intracellulaire moyenne au cours du temps montre une augmentation forte et continue tout au long de l'enregistrement (**Figure 2.4, cercles vides**). Ce résultat met en évidence une incapacité des myoblastes LHCN-M2 à réparer une rupture mécanique de la membrane plasmique d'une taille d'environ 1 μ m.

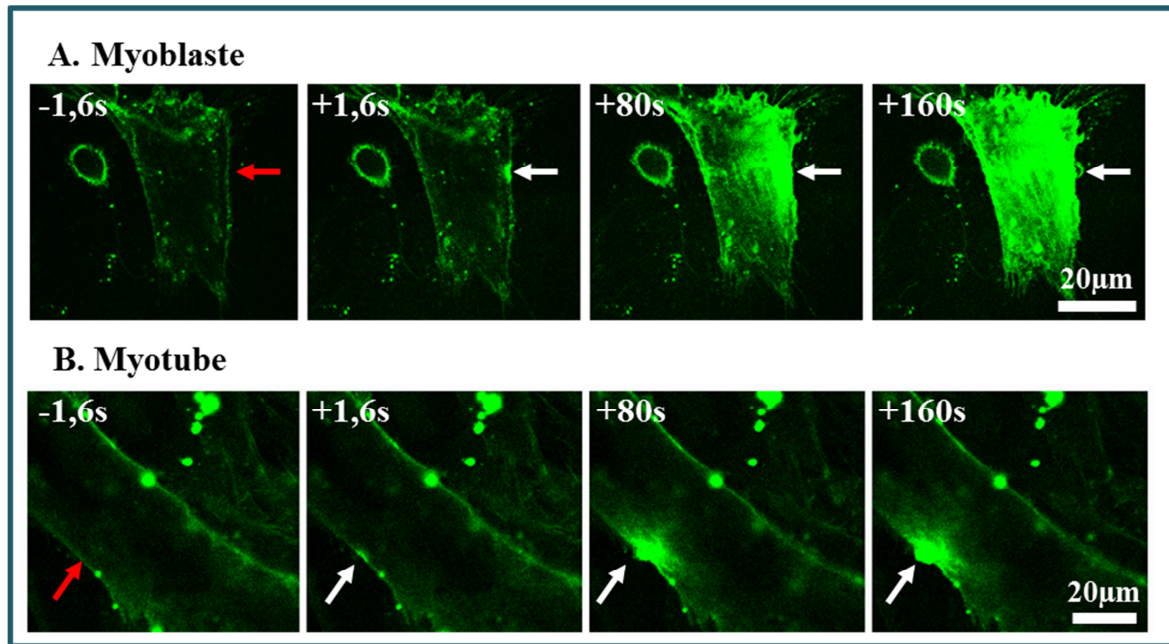


Figure 2.3 : Réponses des myoblastes et myotubes LHCN-M2 aux dommages membranaires après irradiation laser. Les séquences d'images sont représentatives des réponses observées pour un myoblaste et un myotube LHCN-M2 à une irradiation avec un laser d'une longueur d'onde de 820nm et de puissance 110mW (± 5 mW) sur une surface de 1 μ m². Avant irradiation les cellules ont été lavées 3 fois avec du D-PBS+/+ 1mM CaCl₂ froid. Sur toutes les images la zone irradiée est indiquée avec une flèche rouge avant irradiation et une flèche blanche après irradiation. Les temps indiqués correspondent au temps en secondes avant (-) et après (+) irradiation respectivement.

L'incapacité de réparation des myoblastes LHCN-M2 pourrait être liée à l'absence d'expression de la cavéoline-3 et d'autres protéines impliquées dans la réparation membranaire, et dont l'expression est initiée lors de la différenciation/fusion des myoblastes. En effet, il a été observé, pour des cellules musculaires murines, que les myoblastes n'expriment pas MG53, une protéine cruciale pour la réparation membranaire (Cai, Masumiya, Weisleder, Pan, et al. 2009a). Il serait intéressant d'étudier l'expression de cette protéine dans les cellules LHCN-M2.

Pour les myotubes LHCN-M2, la rupture du sarcolemme conduit également à une entrée de FM1-43 dès les premières secondes (**Figure 2.3, myotube, +1,6s, flèche blanche**). En revanche, nous avons observé que 160s après l'irradiation, l'augmentation de la fluorescence intracellulaire reste limitée à une zone restreinte d'environ 100 μ m² autour du site de rupture (**Figure 2.3, myotube, +160s, flèche blanche**).

Pour les myotubes LHCN-M2, l'analyse cinétique des variations d'intensité de fluorescence intracellulaire montre une augmentation relativement faible durant les 70 premières secondes après irradiation puis une stabilisation jusqu'à la fin de l'enregistrement (**Figure 2.4, cercles pleins**). Cet arrêt de l'accroissement de l'intensité de fluorescence intracellulaire traduit un arrêt de l'entrée de FM1-43 dans les cellules irradiées. Ce phénomène est lié à une réparation de la membrane endommagée.

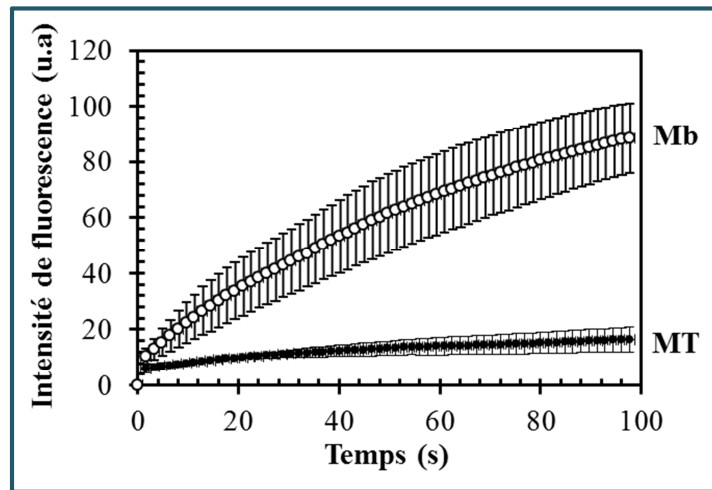


Figure 2.4 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence moyenne du FM1-43, dans les myoblastes et myotubes LHCN-M2 endommagés, au cours du temps. Les données présentées correspondent aux moyennes observées pour 50 cellules (+/- l'écart-type). Pour les myoblastes (Mb ; cercles vides) l'intensité de fluorescence augmente continuellement durant les 160 secondes d'enregistrement suggérant une absence de réparation membranaire sur la durée d'enregistrement. Pour les myotubes (MT ; cercles pleins) l'intensité de fluorescence augmente jusqu' à 70 secondes d'enregistrement avant de se stabiliser, indiquant que la présence d'une réparation membranaire.

Nous en avons conclu que les myotubes LHCN-M2 ont la capacité de réparer des ruptures mécaniques de leur sarcolemme alors que les myoblastes de cette lignée en sont incapables.

A3. Cas de la lignée pathologique 578

Nous avons ensuite testé la capacité de réparation de la membrane plasmique des myoblastes et myotubes de la lignée 578. Nous avons observé, pour les myoblastes comme pour les myotubes, une augmentation du signal de fluorescence intracellulaire dès les premières secondes consécutives à l'irradiation laser (**Figure 2.5, +1,6s**). Comme pour les cellules LHCN-M2, nous avons observé la création d'une rupture modérée d'environ 1µm de large, validant les conditions d'irradiation pour cette lignée pathologique. Nous avons systématiquement observé pour les myoblastes 578, comme pour les myotubes, une entrée massive de FM1-43 intracellulaire 160s après l'irradiation laser (**Figure 2.5, +160s**).

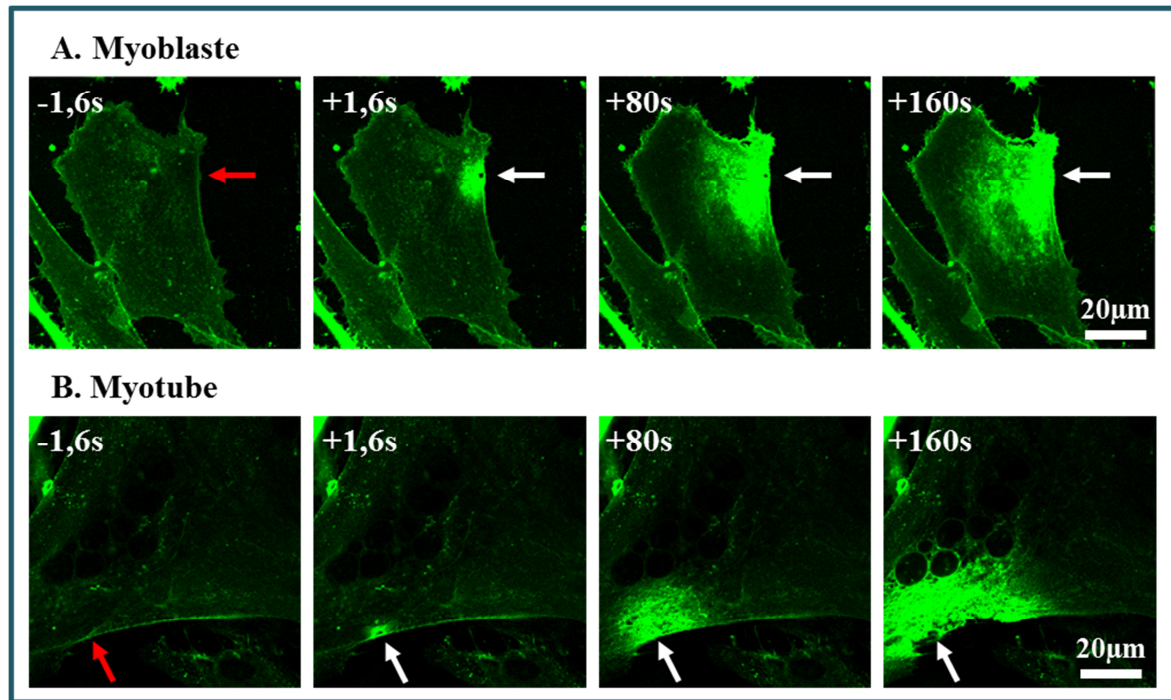


Figure 2.5 : Réponses des myoblastes et myotubes 578 aux dommages membranaires après irradiation laser. Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la légende de la Figure 2.3. On observe une entrée massive de FM1-43 (vert) dans les myoblastes après irradiation laser (flèche). La rupture membranaire conduit le plus souvent à une déchirure de la membrane plasmique des myotubes de cette lignée (+160s).

L'analyse cinétique des variations d'intensité de fluorescence intracellulaire montre une augmentation continue à la fois dans les myoblastes 578 (**Figure 2.6, cercles vides**) et dans les myotubes 578 (**Figure 2.6, cercles pleins**). Ces résultats indiquent que, comme les myoblastes sains LHCN-M2, les myoblastes pathologiques 578 sont incapables de réparer une rupture mécanique de leur membrane plasmique. Ils montrent de plus que, contrairement aux myotubes LHCN-M2, les myotubes 578 sont incapables de restaurer l'intégrité de leur sarcolemme après sa rupture mécanique. L'évolution plus lente de l'intensité de fluorescence pour les myotubes (**Figure 2.6, cercles pleins**), comparé aux myoblastes (**Figure 2.6, cercles vides**), résulte probablement de la différence de taille entre les myoblastes et les myotubes mais pourrait aussi être la conséquence d'une bouchure partielle de la rupture dans les myotubes.

Nous avons également observé qu'environ la moitié des myotubes 578 endommagés se sont déchirés (**Figure 2.5, myotube, +160s, flèche blanche**). Cette déchirure, initiée à partir du site de rupture membranaire, a le plus souvent débuté 1 min après l'irradiation laser (**Figure 2.5, image +80s, flèche blanche**) ce qui traduit une fragilité membranaire qui n'a pas été observée pour les myotubes LHCN-M2.

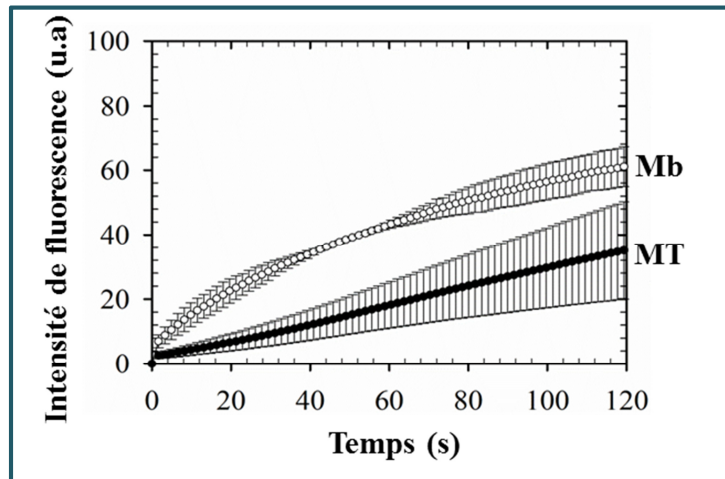


Figure 2.6 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence moyenne du FM1-43, dans les myoblastes et myotubes 578 endommagés, au cours du temps. Les données présentées correspondent aux moyennes observées pour 50 cellules (+/- l'écart-type). Pour les myoblastes (Mb, cercles vides) comme pour les myotubes (MT, cercles pleins), l'intensité de fluorescence intracellulaire moyenne augmente durant toute la durée de l'enregistrement suggérant un défaut de réparation des ruptures membranaires

L'ensemble de ces résultats montre que les myoblastes 578, comme les myoblastes de la lignée saine LHCN-M2 sont incapables de réparer des ruptures mécaniques de leur sarcolemme. Ils montrent également que, contrairement aux myotubes LHCN-M2, les myotubes 578 sont incapables de réparer des ruptures mécaniques de leur sarcolemme. Ce résultat confirme le rôle majeur joué par la dysferline, dont les myotubes 578 sont totalement dépourvus (**Figure 1.11**), dans la réparation membranaire de ruptures mécaniques (Bansal et al. 2003). L'absence de mécanisme de réparation membranaire des cellules 578 est très probablement la cause majeure de l'état pathologique de la patiente dont ont été extraites ces cellules musculaires.

A4. Cas de la lignée pathologique 650

Nous avons ensuite testé la capacité de réparation membranaire des myoblastes et myotubes de la lignée 650. Pour les myoblastes comme pour les myotubes, l'irradiation a été systématiquement suivie d'une augmentation locale de l'intensité de la fluorescence au niveau de la zone de rupture (**Figure 2.7, +1,6s, flèches blanches**) traduisant une entrée de FM1-43 dans les cellules irradiées suite à une rupture du sarcolemme. Nous avons observé une entrée massive de FM1-43 sur la durée de l'enregistrement pour les myoblastes (**Figure 2.7, ligne du haut**) comme pour les myotubes (**Figure 2.7, ligne du bas**), caractérisée par une augmentation importante et continue de l'intensité de fluorescence intracellulaire (**Figure 2.8**). Pour environ la moitié des myotubes endommagés, la rupture a été suivie d'une déchirure à partir de la zone où la membrane a été endommagée (**Figure 2.7 ; ligne du bas ; +80s et +160s, flèches blanches**), comme observé pour les myotubes de la lignée 578.

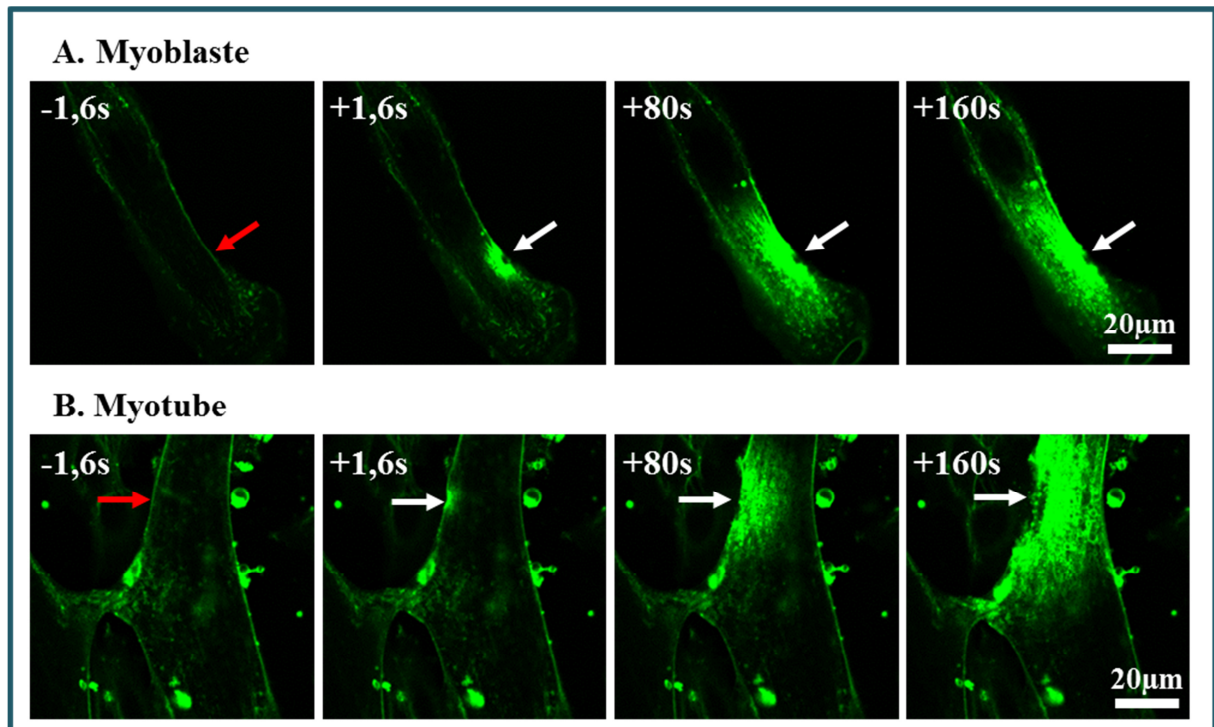


Figure 2.7 : Réponses des myoblastes et myotubes 650 aux dommages membranaires après irradiation laser. Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la légende de la Figure 2.3. On observe une entrée massive de FM1-43 (vert) dans les myoblastes après irradiation laser (flèche). La rupture membranaire conduit le plus souvent à une déchirure de la membrane plasmique des myotubes de cette lignée (+160s)

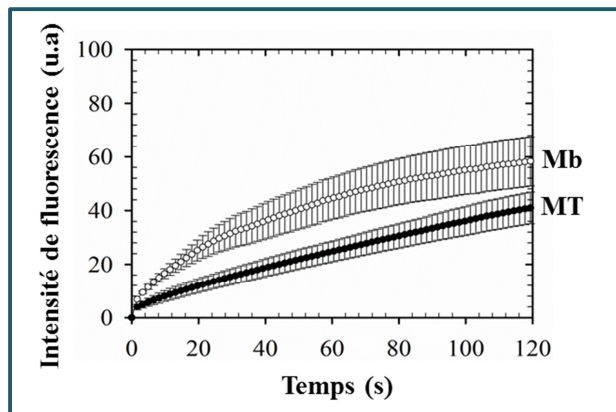


Figure 2.8 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence intracellulaire moyenne du FM1-43, pour les myoblastes et myotubes 650 endommagés, au cours du temps. Les données présentées correspondent aux moyennes observées pour 50 cellules (+/- l'écart-type). Pour les myoblastes (Mb, cercles vides) comme pour les myotubes (MT, cercles pleins), l'intensité de fluorescence intracellulaire moyenne augmente durant toute la durée de l'enregistrement suggérant un défaut de réparation des ruptures membranaires.

Nous pouvons conclure que les myoblastes et les myotubes de la lignée 650 sont, comme les cellules de la lignée 578, incapables de réparer des ruptures mécaniques de leur membrane plasmique. La cavéoline-3 interagit avec la dysferline dans les cellules musculaires squelettiques saines (Matsuda et al. 2001) et les mutations de la cavéoline-3, à l'origine du développement de la LGMD1C, sont responsables d'une localisation subcellulaire anormale de la dysferline. Ces observations laissaient postuler que les cellules déficientes en cavéoline-3 pouvaient être incapable de réparer leur membrane. Néanmoins, à notre connaissance, nos

résultats constituent la première démonstration directe que la cavéoline-3 est indispensable pour la réparation des ruptures mécaniques du sarcolemme chez l'Homme. Ce défaut de réparation membranaire est probablement la cause majeure du développement de la dystrophie des ceintures de type 1C.

A5. Conclusion

Nous avons observé que les myoblastes générés à partir de cellules musculaires striées squelettiques d'un patient sain (LHCN-M2) et de patients souffrant de dystrophie des ceintures de type 2B (578) et 1C (650), sont incapables de réparer des ruptures mécaniques de leur membrane plasmique. L'absence de réparation membranaire des myoblastes est probablement due à l'absence de protéines composant la machinerie de réparation, telles que MG-53 (Cai, Masumiya, Weisleder, Pan, et al. 2009a) et la cavéoline-3 ((Ferruccio Galbiati et al. 1999), (Smythe et al. 2003)). Contrairement à ce qui a été observé dans des cellules musculaires murines (Belanto et al. 2010), nous avons mesuré des niveaux d'expression de la dysferline similaires dans les myoblastes et myotubes LHCN-M2. Le défaut de réparation membranaire observé dans les myoblastes n'est donc pas dû à l'absence de la dysferline.

Au contraire, nous avons observé par western blot et par immunocytofluorescence que l'expression de la cavéoline-3 augmente très significativement lors de la myogénèse. Ce résultat pourrait être une première indication sur la cause du défaut de réparation membranaire observé pour les myoblastes de la lignée LHCN-M2. L'analyse d'autres protéines comme MG53 pourrait nous donner des indications supplémentaires.

Les myotubes de la lignée LHCN-M2 réparent très efficacement (en 70s) des ruptures mécaniques d'au moins $1\mu\text{m}^2$ de surface. Ce résultat confirme l'existence d'une machinerie de réparation membranaire efficace dans les fibres musculaires squelettiques humaines.

Les myotubes de la lignée 578 n'ont pas la capacité de réparer ce type de dommage. L'absence de dysferline dans les myotubes 578 (**cf Figure 1.11**) est très probablement la cause de ce défaut de réparation membranaire. Comme décrit précédemment (Bansal et al. 2003), ce défaut de réparation membranaire est très probablement à l'origine du développement de la LGMD2B diagnostiqué chez le patient à partir duquel a été établie la lignée 578.

Les myotubes de la lignée 650 sont également incapables de réparer des ruptures mécaniques de leur membrane plasmique. A notre connaissance, il s'agit de la première observation directe qu'une déficience en cavéoline-3 conduit à une absence de réparation membranaire. L'origine de cette défaillance pourrait provenir d'une diminution de l'expression de la dysferline ou de la perturbation de son trafic intracellulaire. En effet, il a été montré que la cavéoline-3 interagit avec la dysferline dans des fibres musculaires humaines provenant de patients sains et que dans les fibres musculaires issues de patients atteints de LGMD1C, l'expression de la dysferline est diminuée ou sa distribution subcellulaire perturbée (Matsuda et al. 2001). Il serait intéressant de voir si l'expression de la forme mutée de la cavéoline-3 affectant la lignée 650 a un impact sur la localisation de la dysferline avant ou après rupture de la membrane plasmique des myotubes.

Nos résultats indiquent que la déficience en cavéoline-3 conduit à un défaut de réparation membranaire qui pourrait constituer la cause majeure du développement de la LGMD1C.

B. Perforation de la membrane plasmique par la Streptolysine O :

Afin d'analyser le comportement des cellules musculaires saines et pathologiques après perméabilisation de leur sarcolemme par l'insertion de toxines bactériennes formant des pores, l'effet de la SLO a été étudié sur les trois lignées cellulaires. La SLO est une protéine appartenant à la famille des Cytolysines Dépendant du Cholestérol (CDC). Les protéines de cette famille ont la propriété de former des pores une fois insérées dans des membranes biologiques contenant du cholestérol. La SLO est une protéine monomérique de 61kDa en solution, produite par plusieurs souches de streptocoques β -hémolytiques (groupe A, C et G). Une fois en contact avec des membranes lipidiques contenant du cholestérol elle s'auto-assemble pour former des polymères (**Figure 2.9, étape b**). La polymérisation entraîne un changement de conformation de la SLO permettant son insertion dans la bicouche lipidique (**Figure 2.9, étape c**) (Tweten 2005). Une fois dans la membrane plusieurs polymères s'associent entre eux pour former des structures en anneaux, responsables de la formation des pores dans la bicouche lipidique (**Figure 2.9, étape e**). La liaison aux membranes cibles n'est pas sensible à la température ; elle se fait à basse température, à température ambiante ou à 37°C. De plus le processus de formation des pores est indépendant de la présence d'ATP.

B1. Approche expérimentale

La SLO est une toxine sensible à l'oxydation, son activité étant fortement diminuée en présence d'oxygène ou des dérivés oxygénés du cholestérol (Duncan et Buckingham 1978). Son utilisation nécessite l'ajout d'agents réducteurs comme le DTT. Cette susceptibilité à l'oxygène est due à la présence d'une cystéine très conservée dans la partie C-Terminale des streptolysines. La sensibilité à l'oxydation de la SLO peut être abolie sans affecter l'activité de la toxine en remplaçant cette cystéine par une alanine (Pinkney, Beachey, et Kehoe 1989).

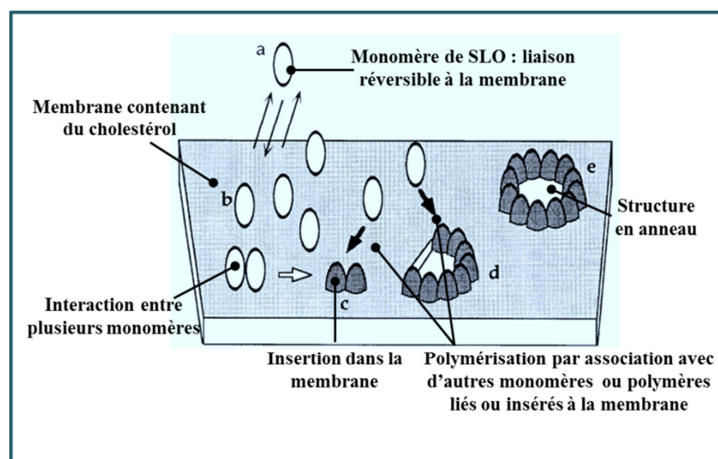


Figure 2.9 : Modèle d'assemblage des structures en anneaux formées par la SLO dans les bicouches lipidiques. Les monomères en solution se lient de façon réversible aux membranes biologiques contenant du cholestérol (**a**) puis s'associent à d'autres monomères (**b**). Les polymères formés s'insèrent dans la membrane (**c**) et s'associent à leur tour à d'autres monomères (**d**) pour former des structures en anneau dont le diamètre peut être supérieur à 30nm. Figure adaptée de (Bhakdi et al. 1996).

Comme nous n'avions pas à disposition cette toxine mutée nous avons utilisé une SLO recombinante commerciale (Abcam) nécessitant une activation par la présence d'agents réducteurs.

Les conditions expérimentales ont été adaptées des travaux réalisés par Babiychuk et ses collaborateurs (Eduard B. Babiychuk et al. 2011) ainsi que des recommandations d'utilisation du fabricant (Abcam). Nous avons tout d'abord déterminé le temps nécessaire pour observer une perméabilisation significative des myotubes par la SLO. Pour cette expérience préliminaire, les myotubes LHCN-M2 ont été incubés avec 300ng/ml de SLO et 5µg/ml de FM1-43 à température ambiante. Les variations d'intensité de fluorescence intracellulaire ont été suivies par vidéo-microscopie. Il a été montré précédemment que la machinerie de réparation mise en place en cas de dommages créés par des toxines bactériennes membranaires est dépendante du Ca^{2+} (Thelestam et Möllby 1983). Afin d'éviter que les cellules ne puissent éliminer les pores créés par la SLO au cours de l'enregistrement, cette première expérience a été réalisée en absence de Ca^{2+} .

Dans ces conditions nous avons observé une augmentation de l'intensité de fluorescence intracellulaire dans les trois minutes suivant l'ajout de la SLO (**Figure 2.10**).

L'augmentation de l'intensité de fluorescence traduit une entrée de FM1-43 dans les myotubes consécutive à la perméabilisation du sarcolemme par la SLO. La quantification de l'intensité de fluorescence intracellulaire au cours du temps montre que l'intensité de fluorescence intracellulaire augmente significativement à partir d'environ 90s après ajout de la SLO (**Figure 2.11**). Ce délai est probablement celui requis pour l'interaction de la SLO avec le sarcolemme, sa polymérisation et la formation de pores, dans nos conditions expérimentales. Nous avons observé une augmentation continue de la fluorescence intracellulaire entre 90 et 180s après ajout de la SLO (**Figure 2.11**). Ce résultat traduit l'incapacité des cellules à réparer les dommages membranaires créés par la toxine bactérienne, comme attendu.

Nous avons donc conclu que la perméabilisation du sarcolemme par la SLO est indépendante de la présence du Ca^{2+} , condition sinequanone pour étudier l'influence du Ca^{2+} sur la machinerie de réparation de ce type de dommage. Nous avons conclu également que 2 minutes d'incubation de la SLO avec les cellules étaient suffisantes pour observer une perméabilisation significative des myotubes.

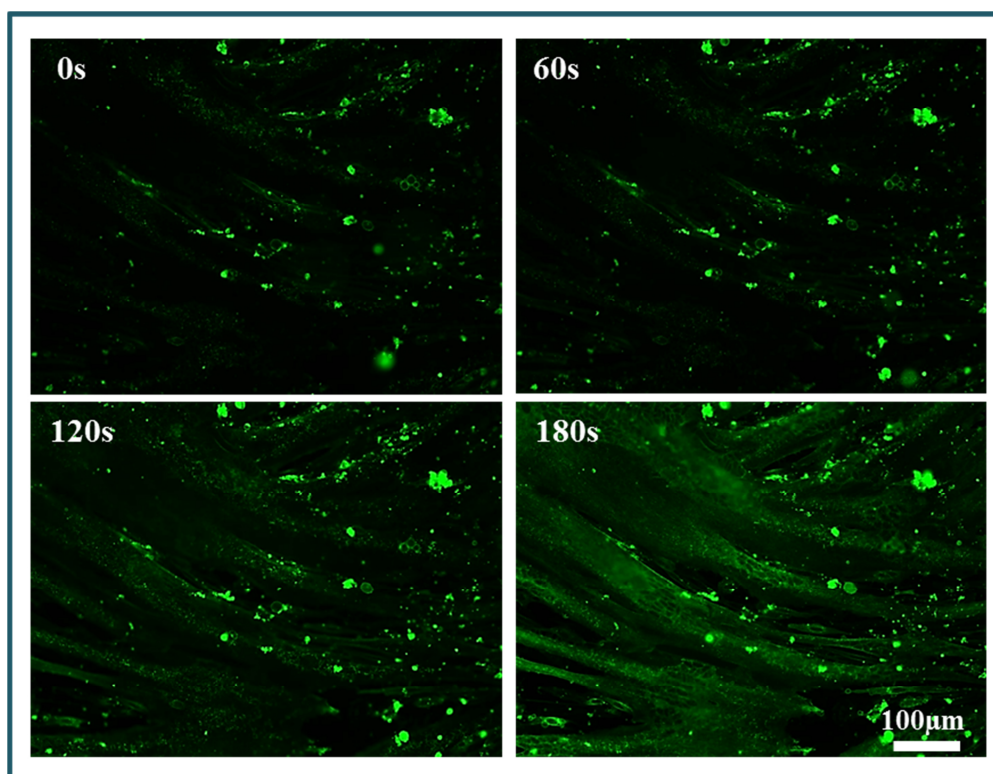


Figure 2.10 : Perméabilisation du sarcolemme des myotubes LHCN-M2 par la SLO. Les myotubes LHCN-M2 ont été incubés en présence de 300ng/ml de SLO et de 5µg/ml de FM1-43 (vert) à température ambiante. Les cellules ont été photographiées toutes les 20 secondes par microscopie de fluorescence. L'intensité de fluorescence intracellulaire augmente significativement environ 90s après ajout de la SLO.

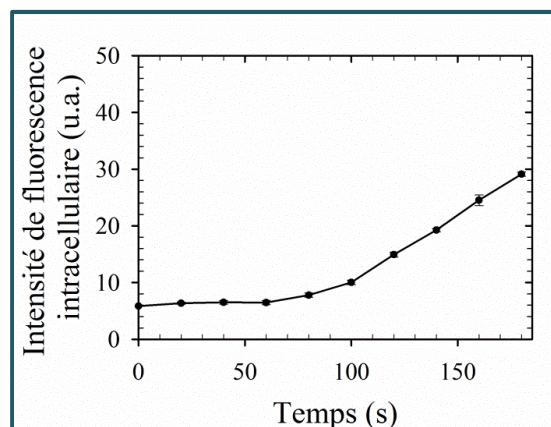


Figure 2.11 : Evolution de l'intensité de fluorescence intracellulaire des myotubes LHCN-M2 incubés en présence de SLO et en absence de calcium. Les myotubes LHCN-M2 ont été incubés en présence de 300ng/ml de SLO et 5µg/ml de FM1-43, en absence de Ca^{2+} , à température ambiante. Les myotubes ainsi traités ont été photographiés toutes les 20 secondes par microscopie de fluorescence. L'intensité de fluorescence intracellulaire a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ Macbiophotonics. Les données présentées sont des valeurs moyennes ($n=10$) \pm l'écart-type.

Afin d'étudier le comportement des myotubes des trois lignées cellulaires (LHCN-M2, 650 et 578) en réponse aux dommages créés par l'insertion de la SLO, le protocole suivant a été appliqué : les cellules ont été incubées avec 300ng/ml de SLO pendant 2 minutes à température ambiante, en présence ou non de Ca^{2+} . Afin de permettre, le cas échéant, aux cellules de réparer les dommages causés par la SLO et de restaurer leur membrane plasmique, l'excès de SLO a été retiré par lavage après ces deux minutes d'incubation. 5µg/ml de FM1-

43 ont ensuite été ajoutés, cet ajout marquant le début de la phase d'observation par vidéo-microscopie de fluorescence (0s).

B2. Cas de la lignée saine LHCN-M2

En absence de Ca^{2+} , nous avons observé une augmentation de l'intensité de fluorescence intracellulaire des myotubes LHCN-M2 au cours des 5 minutes suivant l'ajout du FM1-43 (**Figure 2.12, sans Ca^{2+}**). Une nouvelle fois, cette augmentation traduit l'entrée de FM1-43 dans le cytoplasme des myotubes, consécutive à la perméabilisation des cellules. Le suivi cinétique des variations d'intensité de fluorescence intracellulaire montre que le FM 1-43 pénètre dans la cellule quasiment immédiatement après son ajout (**Figure 2.13, courbe rouge**). Nous avons observé une augmentation continue de la fluorescence, indiquant l'absence de réparation de la membrane plasmique. L'activité de la SLO est fortement diminuée en présence d'oxygène et son utilisation nécessite la présence dans le tampon d'agents réducteurs, tel que le DTT. Nous avons vérifié que les effets observés n'étaient pas dus à la présence de cet agent réducteur en incubant les cellules dans du tampon dépourvu de SLO. Dans ce cas nous n'avons pas observé d'entrée de FM1-43 dans les myotubes (**Figure 2.12, Tampon sans Ca^{2+} et Figure 2.13, courbe bleue**). La SLO est donc bien responsable de la perméabilisation membranaire observée sur les cellules.

En présence de Ca^{2+} , nous n'avons pas observé variation de l'intensité de fluorescence intracellulaire (**Figure 2.12, avec Ca^{2+} et Figure 2.13, courbe verte**), ce qui suggère que l'effet perméabilisant de la SLO sur les myotubes LHCN-M2 a été endigué durant les 2 minutes d'incubation avec la toxine précédant l'ajout de FM1-43. Ce résultat indique que les myotubes LHCN-M2 possèdent une machinerie permettant d'éliminer les pores membranaires formés par l'insertion de la SLO.

Cette première expérience a validé les conditions expérimentales qui permettent de discriminer sans aucun doute possible entre l'absence et la présence de mécanisme de réparation membranaire. Nous avons pu conclure que les myotubes LHCN-M2 possèdent une machinerie dépendante du Ca^{2+} capable de réparer les dommages membranaires engendrés par l'insertion de toxines bactériennes.

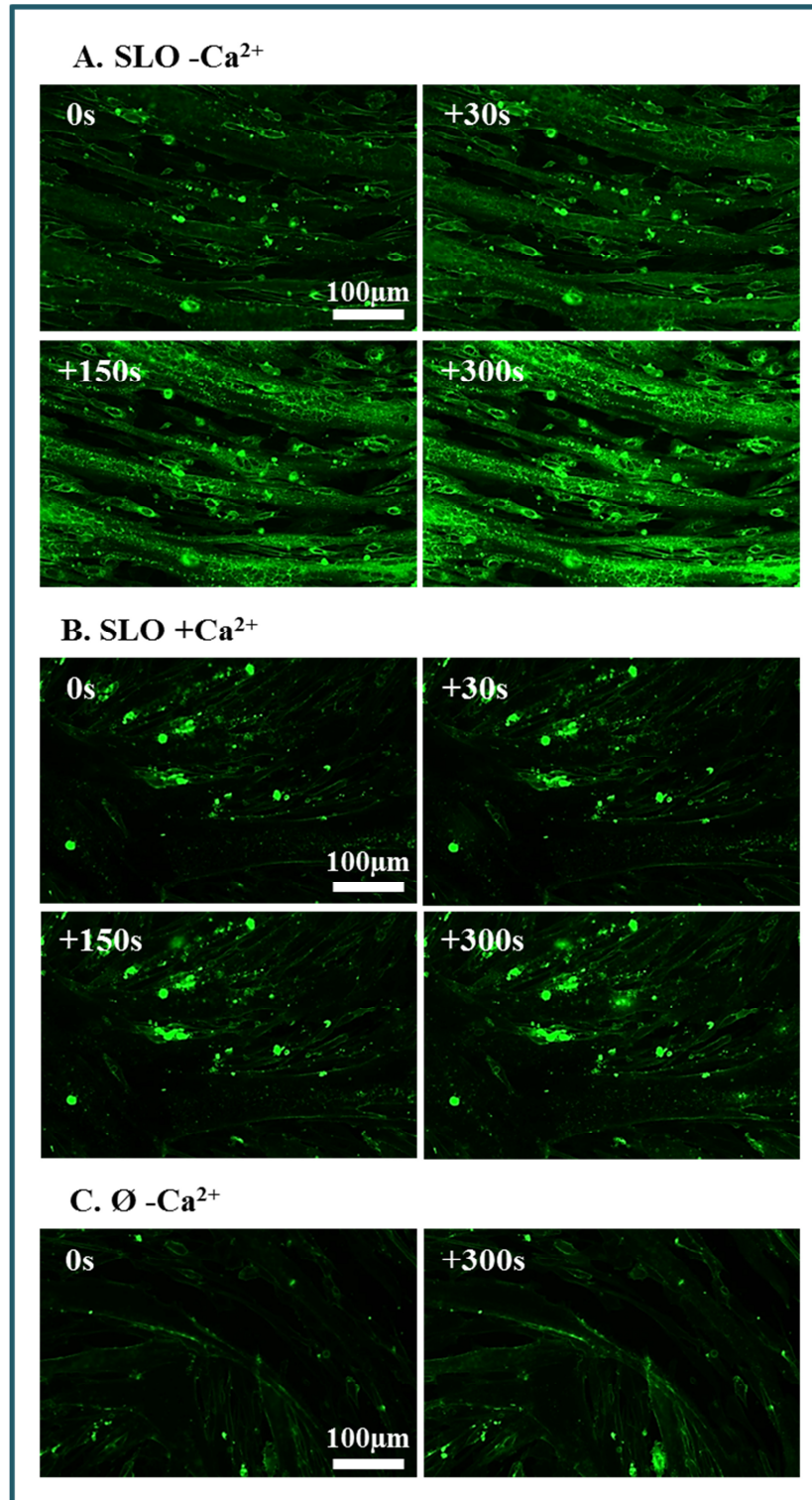


Figure 2.12 : Réponse des myotubes LHCN-M2 après exposition à la SLO en présence ou en absence de calcium. Les séquences d'images sont représentatives des réponses observées pour les myotubes LHCN-M2 après incubation pendant 2 min avec 300ng/ml de SLO à température ambiante en absence (**A et C**) ou en présence de 1mM Ca²⁺ (**B**). Après les 2 minutes d'incubation, les cellules ont été lavées avec du tampon afin de retirer l'excès de SLO non insérée dans les sarcolemmes. L'observation en microscopie de fluorescence a été initiée immédiatement après ajout de 5µg/ml de FM1-43 (vert, T0). Les temps indiqués en secondes correspondent aux délais après ajout du FM1-43. Une expérience contrôle a été réalisée en absence de SLO et en absence de Ca²⁺ (**C**).

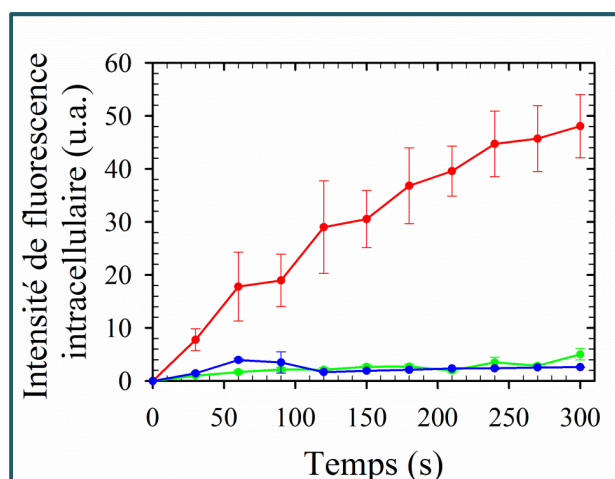


Figure 2.13 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence intracellulaire du FM1-43 au cours du temps dans les myotubes de la lignée LHCN-M2 traités par la SLO en présence ou en absence de calcium. Les myotubes ont été traités comme indiqué dans la légende de la Figure 2.12. Les données présentées correspondent aux intensités de fluorescence moyennes ($n=15$, \pm l'écart-type) mesurées en absence de Ca^{2+} et de SLO (bleu), en absence de Ca^{2+} et en présence de SLO (rouge) et en présence de Ca^{2+} et de SLO (vert). Pour les myotubes traités à la SLO en absence de Ca^{2+} , l'intensité intracellulaire moyenne de fluorescence augmente durant toute la durée de l'enregistrement suggérant un défaut de réparation membranaire.

B3. Cas de la lignée pathologique 578

Nous avons observé précédemment que les myotubes de la lignée 578 sont incapables de réparer leur sarcolemme suite à une rupture mécanique par irradiation laser, ce défaut étant probablement dû à l'absence d'expression de la dysferline.

Nous nous sommes intéressés aux conséquences potentielles de l'absence de dysferline sur le comportement des myotubes en présence de SLO. Comme dans le cas de la lignée LHCN-M2, nous avons observé une augmentation de l'intensité de fluorescence intracellulaire des myotubes traités par la SLO en absence de Ca^{2+} (**Figure 2.14, Sans Ca^{2+}**). Ce résultat indique une entrée de FM1-43 dans le sarcoplasme consécutive à la perméabilisation des myotubes par la SLO. L'analyse cinétique des variations d'intensité de fluorescence intracellulaire témoigne d'une augmentation immédiate de la fluorescence dès l'ajout du FM1-43 (**Figure 2.15, courbe rouge**). Nous avons observé une augmentation continue de l'intensité de fluorescence sur toute la durée de l'enregistrement indiquant une absence de réparation membranaire. Comme observé précédemment sur les myotubes LHCN-M2, nous avons vérifié que l'effet observé était strictement dépendant de la présence de SLO (**Figure 2.14, Tampon sans Ca^{2+}**).

En présence de Ca^{2+} , nous avons observé une augmentation de l'intensité de fluorescence intracellulaire dans les myotubes 578 (**Figure 2.14, Avec Ca^{2+}**). L'analyse cinétique des variations d'intensité de fluorescence intracellulaire montre une augmentation immédiate dès l'ajout de FM1-43 et continue tout le long de l'enregistrement (**Figure 2.15, courbe verte**). Ce résultat indique que les myotubes 578 sont incapables d'éliminer les pores créés par la SLO, même en présence de Ca^{2+} . L'évolution de l'intensité de fluorescence est significativement plus lente en présence (**Figure 2.15, courbe verte**) qu'en absence de Ca^{2+} (**Figure 2.15, courbe rouge**), indiquant la mise en place de processus de réparation qui reste néanmoins défaillant.

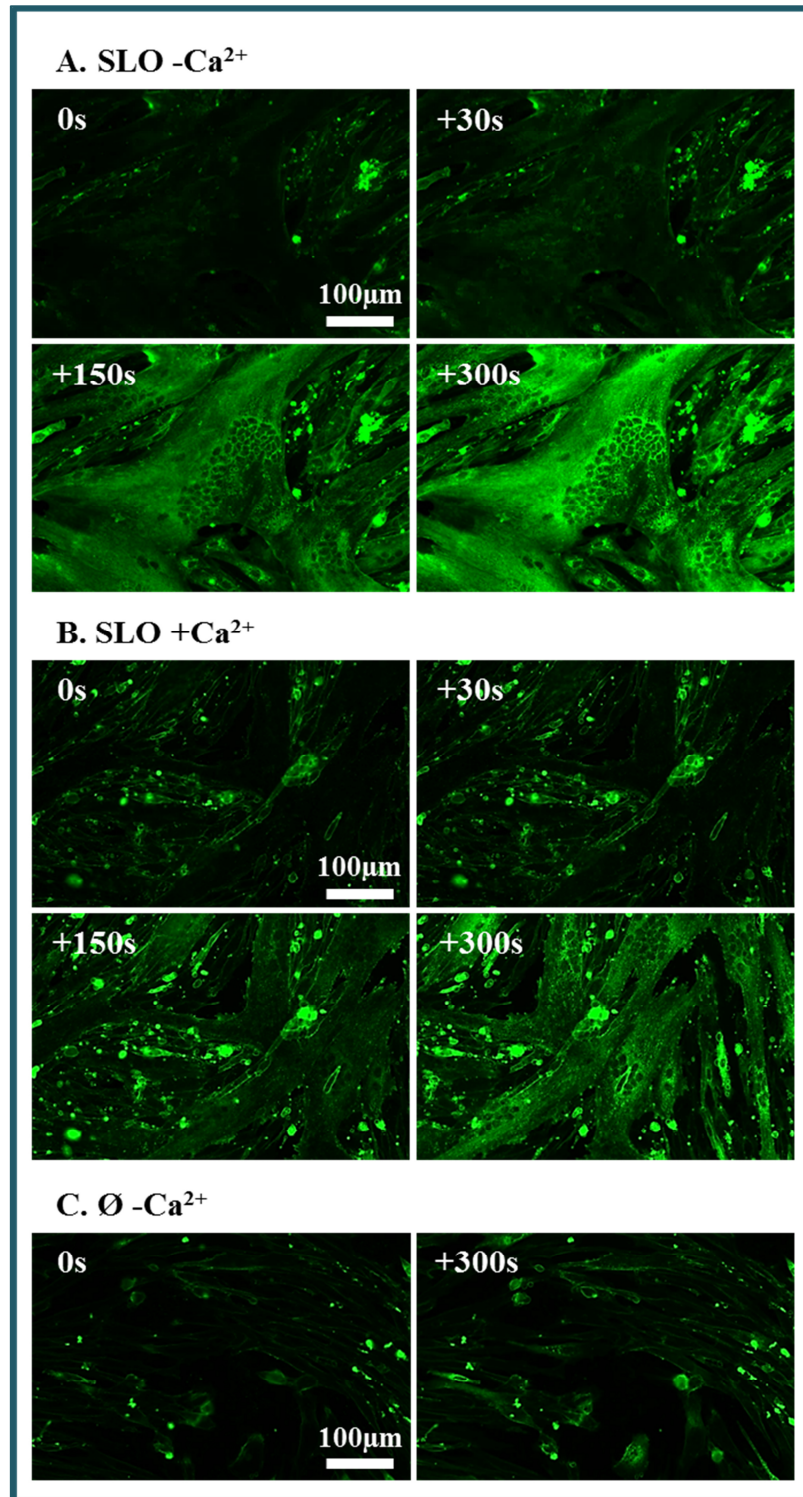


Figure 2.14 : Réponse des myotubes 578 après leur exposition à la SLO en présence ou en absence de calcium. Les séquences d'images sont représentatives des réponses observées pour les myotubes 578 après incubation pendant 2 min avec 300ng/ml de SLO à température ambiante en absence (**A et C**) ou en présence de 1mM Ca²⁺ (**B**). Après les 2 minutes d'incubation, les cellules ont été lavées avec du tampon afin de retirer l'excès de SLO non insérée dans les sarcolemmes. L'observation en microscopie de fluorescence a été initiée immédiatement après ajout de 5µg/ml de FM1-43 (vert, T0). Les temps (en secondes) indiqués correspondent aux délais après ajout du FM1-43. Une expérience contrôle a été réalisée en absence de SLO et en absence de Ca²⁺ (**C**)

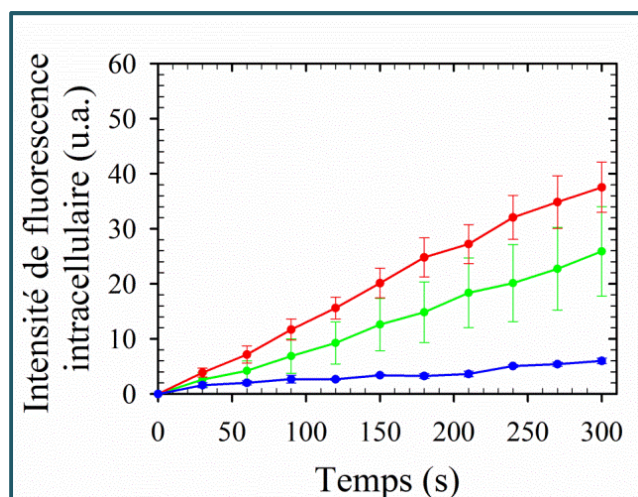


Figure 2.15 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence moyenne du FM1-43 au cours du temps dans les myotubes de la lignée 578 traités par la SLO en présence ou en absence de calcium. Les cellules ont été traitées comme indiqué dans la légende de la Figure 2.14. Les données présentées correspondent aux intensités de fluorescence moyennes ($n=20$, \pm l'écart-type) mesurées en absence de Ca^{2+} et de SLO (bleu), en absence de Ca^{2+} et en présence de SLO (rouge) et en présence de Ca^{2+} et de SLO (vert). Pour les myotubes traités à la SLO en présence ou en absence de Ca^{2+} , l'intensité intracellulaire moyenne de fluorescence augmente durant toute la durée de

l'enregistrement suggérant un défaut de réparation membranaire.

Nous avons donc conclu que la machinerie protéique de réparation que possèdent les myotubes de la lignée saine LHCN-M2, leur permet de restaurer l'intégrité de leur sarcolemme suite aux dommages créés par l'insertion de SLO, est défaillante dans les myotubes 578. Ce résultat suggère que la dysferline est un membre de la machinerie protéique de réparation lors de l'exposition des cellules à des toxines formant des pores.

B4. Cas de la lignée pathologique 650

Nous avons enfin analysé la réponse des myotubes de la lignée 650 après exposition à la SLO. En absence de Ca^{2+} , pour les myotubes 650, une augmentation de l'intensité de fluorescence intracellulaire a été observée immédiatement après ajout du FM1-43 et ce de façon continue tout au long de l'enregistrement (**Figure 2.16, Sans Ca^{2+} et Figure 2.17, courbe rouge**). En absence de Ca^{2+} , les myotubes 650 sont incapables de contrer l'action de la SLO.

En présence de Ca^{2+} , nous n'avons observé aucune variation de l'intensité de fluorescence intracellulaire (**Figure 2.16, Avec Ca^{2+}**). La quantification de la fluorescence intracellulaire au cours du temps montre que l'intensité de fluorescence reste quasiment nulle tout au long de l'expérience (**Figure 2.17, courbe verte**). Ce résultat, similaire à celui obtenu avec la lignée saine LHCN-M2, montre que la déficience en cavéoline-3 n'affecte pas la capacité de réparation des dommages membranaires causés par la SLO.

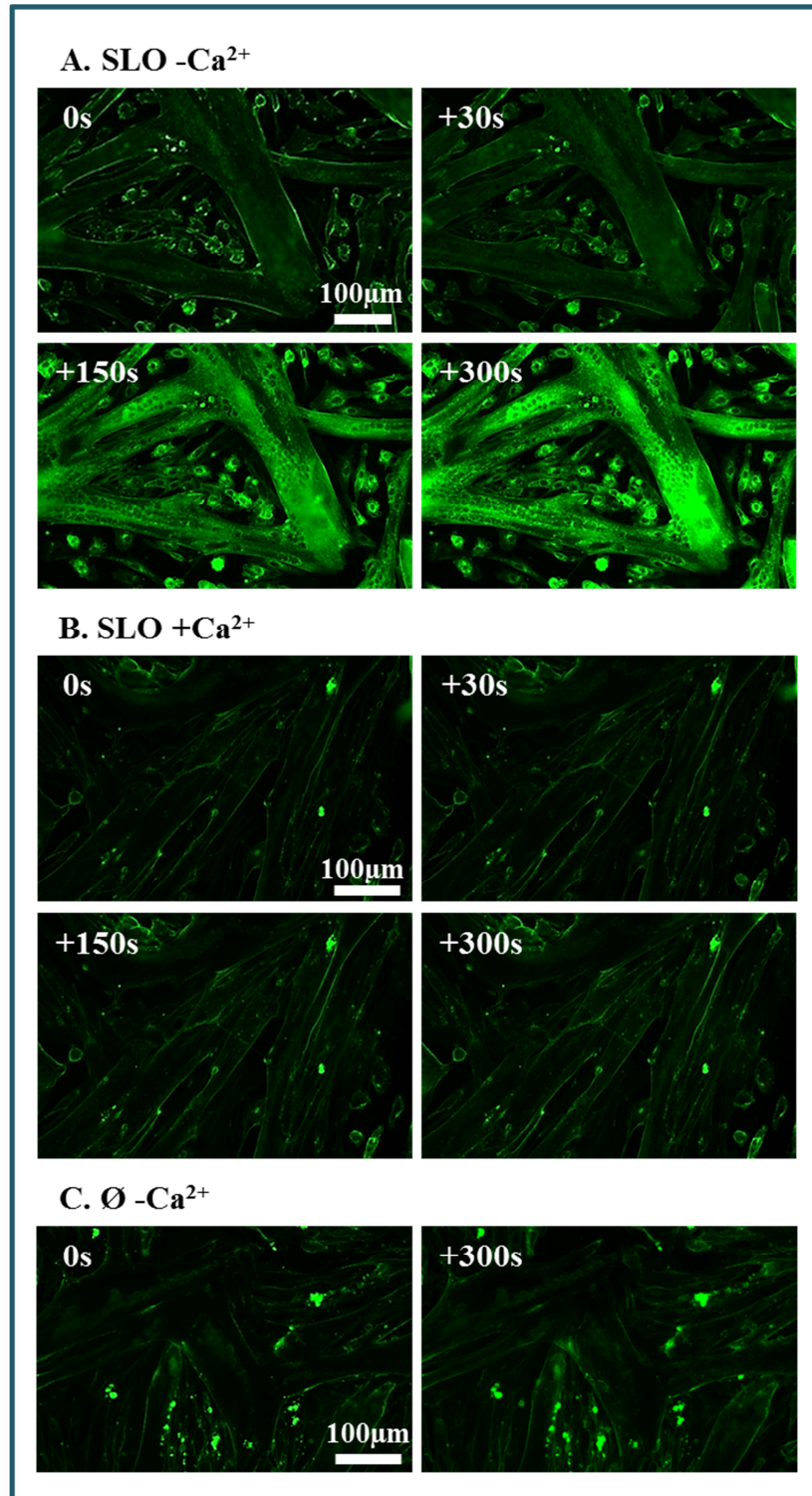


Figure 2.16: Réponse des myotubes de la lignée 650 après exposition à la SLO en absence ou en présence de calcium. Les séquences d'images sont représentatives des réponses observées pour les myotubes 650 après incubation pendant 2 min avec 300ng/ml de SLO à température ambiante en absence (A et C) ou en présence de 1mM Ca²⁺ (B). Après les 2 minutes d'incubation, les cellules ont été lavées avec du tampon afin de retirer l'excès de SLO non liée au sarcolemme des cellules. L'observation en microscopie de fluorescence a été initiée immédiatement après ajout de 5µg/ml de FM1-43 (vert, T0). Les temps (en secondes) indiqués correspondent aux délais après ajout du FM1-43. Une expérience contrôle a été réalisée en absence de SLO et en absence de Ca²⁺ (C).

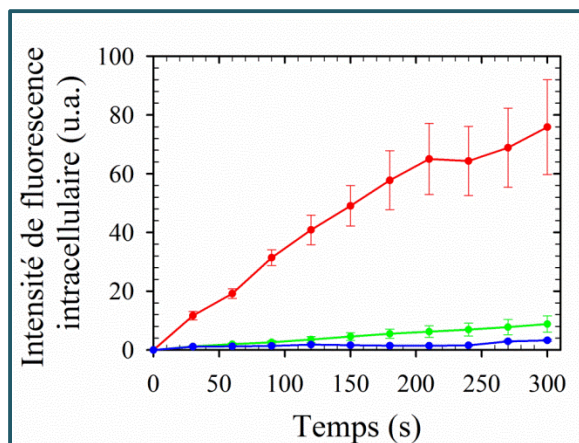


Figure 2.17 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence moyenne du FM1-43 au cours du temps dans les myotubes de la lignée 650 après exposition à la SLO en présence ou en absence de calcium. Les cellules ont été traitées comme indiqué dans la légende de la Figure 2.16. Les données présentées correspondent aux intensités de fluorescence moyennes ($n=10$, \pm l'écart-type) mesurées en absence de Ca^{2+} et de SLO (bleu), en absence de Ca^{2+} et en présence de SLO (rouge) et en présence de Ca^{2+} et de SLO (vert). Pour les myotubes traités à la SLO en absence de Ca^{2+} , l'intensité intracellulaire moyenne de fluorescence

augmente durant toute la durée de l'enregistrement suggérant un défaut de réparation membranaire.

B5. Conclusion

Les myotubes sains possèdent un (des) mécanisme(s) de réparation membranaire permettant de répondre efficacement à la fois à une rupture mécanique micrométrique et à la formation d'une multitude de pores protéiques membranaires par l'insertion de toxines bactériennes. Ce(s) mécanisme(s), qui dépend(ent) strictement de la présence de Ca^{2+} à une concentration de l'ordre du mM, reste(nt) à élucider. En aucun cas nous avons observé de bourgeonnement membranaire suite aux différents dommages, suggérant que ce n'est pas ce type de mécanisme qui se met en place dans les cellules musculaires striées squelettiques humaines. Les paramètres d'acquisitions des intensités de fluorescence étant différents entre les expériences de rupture mécanique et les expériences utilisant la SLO, il n'est pas possible de comparer les cinétiques de réparation.

Les myotubes 578, dépourvus de dysferline, sont incapables de réparer leur sarcolemme suite à des dommages mécaniques ou durant son exposition à la SLO. Le patient atteint de LGMD2B, à partir duquel a été établie la lignée 578, est composé par un tissu musculaire strié squelettique d'une très grande fragilité, tout dommage membranaire conduisant très probablement à la nécrose des fibres musculaires. Ce résultat suggère également que la dysferline serait impliquée dans le(s) processus de réparation des deux types de dommage membranaire. Ce résultat confirme le rôle majeur joué par la dysferline dans la réparation membranaire (Bansal et al. 2003).

Enfin, alors qu'ils sont incapables de réparer une rupture mécanique micrométrique de leur sarcolemme, les myotubes de la lignée 650 ont la capacité de réparer les dégâts causés par l'insertion membranaire de la SLO. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce résultat inattendu. Tout d'abord il est possible que la cavéoline-3 ne soit pas impliquée dans le mécanisme mis en œuvre pour l'élimination des pores membranaires formés par des toxines bactériennes. Cela supposerait qu'au moins deux mécanismes différents existeraient, l'un se mettant en place dans le cas de rupture mécanique micrométrique, l'autre dans le cas d'une perméabilisation membranaire nanométrique par des toxines bactériennes. On peut également postuler que la cavéoline-3 est impliquée dans les

Résultats et conclusions

mécanismes de réparation membranaire quel que soit le type de dommage, mais que la mutation que porte cette lignée (R27>Q) n'affecte pas sa fonction dans l'élimination des pores protéiques. Cela supposerait également que les mécanismes de réparation ne sont pas strictement identiques, la cavéoline-3 ayant par exemple des partenaires différents.

Chapitre n°3 : Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire du muscle strié squelettique humain sain

Le muscle strié squelettique est probablement le tissu le plus étudié dans le domaine de la réparation membranaire. Néanmoins, la composition exacte de la machinerie protéique responsable de la réparation des dommages membranaires est à découvrir. De plus, les mécanismes mis en jeu lors du processus de réparation membranaire restent très hypothétiques. Plusieurs mécanismes coexistent probablement dans les cellules musculaires, leur mise en place dépendant du type de dommage.

Différents travaux ont suggéré l'implication de certaines Annexines (Anx) dans la réparation membranaire. Dans des cellules primaires de muscle de souris, l'AnxA1 et l'AnxA2 agrégeraient les vésicules cytoplasmiques lors de la formation du patch lipidique et permettraient son recrutement au niveau de la zone de rupture en interagissant avec la dysferline (Lennon et al. 2003). Pour le poisson zèbre, la réparation membranaire du muscle squelettique serait basée sur la formation d'un échafaudage hautement organisé impliquant la dysferline, l'AnxA1, l'AnxA2 et l'AnxA6 (Roostalu et Strähle 2012). Enfin, une isoforme atypique de l'AnxA7 avec une localisation subcellulaire altérée a été observée dans les souris MDX modèle de dystrophie musculaire de Duchenne (Selbert et al. 1996). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur le rôle des Anx dans la réparation membranaire du muscle strié squelettique humain.

L'équipe a montré que l'AnxA5 joue un rôle crucial dans la réparation membranaire des cellules périvasculaires murines (Bouter et al. 2011). En formant un réseau bidimensionnel sur les bords de la zone de rupture, elle stabilise la membrane endommagée et empêche la propagation de la rupture en s'opposant aux forces de tension exercées par le cytosquelette cortical. Ce rôle de l'AnxA5 a été très récemment confirmé dans des cellules trophoblastiques humaines (Carmeille et al. 2015). Ces résultats sont décrits dans la Partie B de ce manuscrit.

L'objectif de l'étude décrite ci-dessous était de déterminer si l'AnxA5 jouait un rôle dans la réparation membranaire du muscle strié squelettique humain

A. Expression et distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les cellules LHCN-M2 intactes :

Nous avons tout d'abord évalué le taux d'expression de l'AnxA5 dans les myoblastes et les myotubes LHCN-M2 par western blot (**Figure 3.1**). Nous avons observé que l'AnxA5 est exprimée de façon équivalente dans les myoblastes (**Figure 3.1, Mb**) et les myotubes (**Figure 3.1, MT**). En comparaison à un dépôt de 100ng d'AnxA5 recombinante (**Figure 3.1, AnxA5 pure**), nous avons estimé que la quantité d'AnxA5 endogène dans ces cellules est de l'ordre de 9µg/mg (± 2) d'extraits protéiques totaux.

Résultats et conclusions

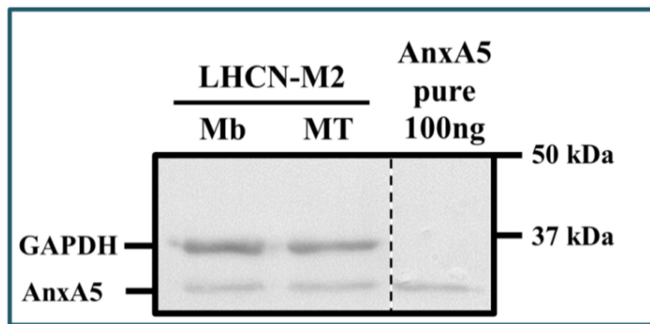


Figure 3.1 : Expression de l'Annexine-A5 dans les myoblastes et myotubes LHCN-M2. Le contenu en AnxA5 des myoblastes et myotubes a été quantifié par western blot en comparaison avec un dépôt de 100ng d'AnxA5 recombinante (AnxA5 pure). 10µg d'extraits protéiques totaux de myoblastes et myotubes à J3 ont été analysés. L'AnxA5 a été détectée avec un anticorps monoclonal de souris. La protéine GAPDH a été utilisée comme témoin de dépôt.

L'AnxA5 représenterait ainsi jusqu'à 1% de la masse protéique totale dans le muscle strié squelettique humain. Un taux similaire a été mesuré dans des fibroblastes (Schlaepfer et Haigler 1990), (Jennifer L. Barwise et Walker 1996) et des trophoblastes humains (Carmeille et al. 2015) confirmant le fait que l'AnxA5 est une protéine ubiquitaire et très abondante dans la majorité des tissus.

Nous avons ensuite analysé la distribution subcellulaire de l'AnxA5 endogène dans les myoblastes et les myotubes par immunocytofluorescence (**Figure 3.2**). Dans les myoblastes, l'AnxA5 est localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (**Figure 3.2A**). Le marquage homogène et diffus, observé dans le cytoplasme, laisse penser que l'AnxA5 est présente dans le cytosol. Pour les myotubes, l'AnxA5 est uniquement cytoplasmique (**Figure 3.2B**). A proximité des noyaux, nous avons parfois observé un marquage d'aspect fibreux (**Figure 3.2C**). Nous avons observé que dans ces régions périnucléaires l'AnxA5 co-localise avec les filaments d'actine (**Figure 3.2D, E, F**). Il est donc possible que dans les myotubes une partie de l'AnxA5 soit en interaction avec les microfilaments, comme observé pour les plaquettes sanguines activées (Tzima et al. 1999).

La localisation à la fois cytosolique et nucléaire de l'AnxA5 dans les myoblastes est en accord avec des observations faites sur d'autres lignées cellulaires comme la lignée de fibroblastes humaines HFF (J. L. Barwise et Walker 1996), la lignée périvasculaire murine PVC (Bouter et al. 2011) ou encore la lignée de trophoblastes humains BeWo (Carmeille et al. 2015). L'absence d'AnxA5 dans les noyaux des myotubes est en revanche une observation plus originale.

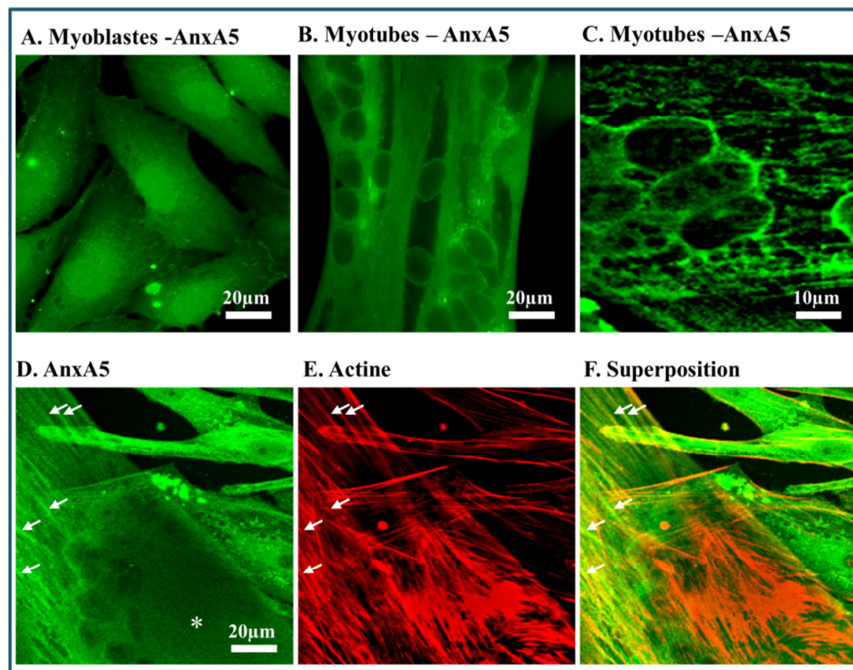


Figure 3.2 : Distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 dans les myoblastes et les myotubes de la lignée LHCN-M2. Les cellules ont été fixées 5 min à -20°C avec du méthanol et marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-AnxA5 1h à température ambiante. Les complexes anticorps primaires-AnxA5 ont été mis en évidence à l'aide d'un anticorps secondaire polyclonal de chèvre conjugué au fluorochrome Alexa 488 (vert, A à D). Dans les myoblastes (A), l'AnxA5 est localisée dans le cytosol ainsi que dans le noyau. Dans les myotubes, l'AnxA5 est uniquement cytoplasmique (B). Dans certains cas, pour les zones périnucléaires, nous avons observé à fort grossissement que le marquage de l'AnxA5 était d'aspect fibreux suggérant qu'elle pourrait co-localiser avec des protéines du cytosquelette (C et D). Le co-marquage de l'actine, à l'aide de phalloïdine-TRITC (rouge, E), montre que, par endroit, l'AnxA5 colocalise avec les fibres d'actine (flèches). L'astérisque (*) montre une zone où l'AnxA5 est totalement cytosolique. F : superposition des images D et E.

La localisation nucléaire de l'AnxA5 reste une énigme. Théoriquement sa masse moléculaire de 35kDa et ses dimensions de $6 \times 4 \times 3 \text{ nm}^3$ (Huber, Römis, et Paques 1990) lui permettent de diffuser passivement à travers les pores nucléaires, la limite de taille pour la diffusion passive d'une protéine à travers ces pores étant estimée à 9 nm de diamètre (Paine, Moore, et Horowitz 1975), (Hinshaw, Carragher, et Milligan 1992). Les différences de localisation de l'AnxA5 entre les myoblastes et les myotubes suggèrent donc des mécanismes de rétention/import/export différents entre ces cellules. Pour le moment, aucun signal de localisation nucléaire (NLS) connu n'a été identifié dans la séquence protéique de l'AnxA5. Les connaissances sur les mécanismes et signaux de rétention/import/export nucléaire restent incomplètes car plusieurs protéines comme le MIF (macrophage migration inhibitory factor), la galectine-1 ou l' α -synuclein ne possèdent pas de NLS mais ont été décrites comme ayant une localisation nucléaire (Arnoys et Wang 2007). Il est probable que, comme pour ces protéines, l'AnxA5 possède un ou des NLS qui n'ont pas encore été identifiés. Néanmoins, la localisation nucléaire de l'AnxA5 pourrait aussi provenir d'un artefact lié à la culture cellulaire *in vitro*. Il a été décrit que la localisation nucléaire de l'AnxA5 dans les fibroblastes

HFF et dans la lignée d'ostéosarcome MG-63 dépend de la présence de facteurs de croissance contenus dans le sérum (Jennifer L. Barwise et Walker 1996), (Mohiti, Caswell, et Walker 1997). Alors que l'AnxA5 est présente dans le noyau de ces cellules cultivées en milieu complet, la culture en absence de sérum pendant 96 heures entraîne une délocalisation de l'AnxA5 nucléaire. Nous avons testé si l'absence de sérum dans le milieu de différenciation était la cause de la délocalisation nucléaire de l'AnxA5 dans les myotubes. Pour ce faire, nous avons cultivé des myotubes dans du milieu de croissance en présence de 20% sérum pendant 72 heures. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé la présence d'AnxA5 nucléaire (**Figure 3.3**). Le sérum contient un ensemble de facteurs de croissance et la présence d'AnxA5 dans le noyau des myoblastes pourrait être liée à l'activité mitotique de ces cellules. Les myotubes sont des cellules post-mitotiques qui ont perdu leur capacité à se diviser. Ainsi, même en présence des facteurs de croissance contenus dans le sérum, l'AnxA5 resterait dans le cytoplasme des myotubes. Le rôle potentiel de l'AnxA5 dans la prolifération cellulaire reste néanmoins à démontrer.

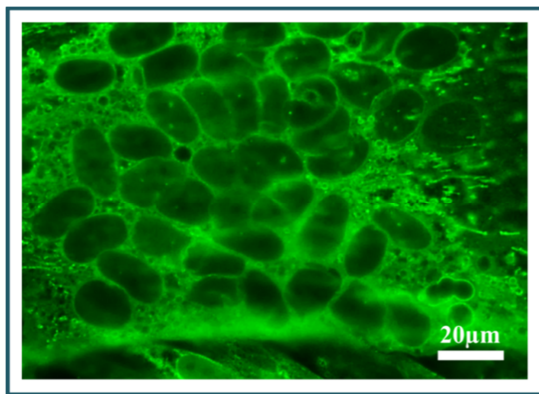


Figure 3.3 : Localisation subcellulaire de l'AnxA5 dans les myotubes LHCN-M2 cultivés en présence de sérum. Les myoblastes ont été incubés pendant 72h dans du milieu de différenciation puis les myotubes à J3 ont été incubés dans du milieu de croissance contenant 20% sérum. Les myotubes ont été fixés au méthanol et immunomarkés pour l'AnxA5, comme décrit dans la légende de la Figure 3.2. Dans ces conditions, l'AnxA5 reste localisée dans le cytoplasme des myotubes.

B. Distribution subcellulaire et trafic de l'Annexine-A5 dans les cellules LHCN-M2 endommagées :

La plupart, des protéines impliquées dans la réparation membranaire, s'accumule au niveau du site de rupture suite à un dommage membranaire. C'est le cas de la dysferline (Glover et Brown 2007), de la cavéoline-3 (Corrotte et al. 2013) et de MG53 (Cai, Masumiya, Weisleder, Matsuda, et al. 2009), par exemple. L'équipe a montré que l'AnxA5 est recrutée au site de rupture en quelques secondes après un dommage mécanique des cellules périvasculaires murines (Bouter et al. 2011). Le recrutement d'une protéine à la zone membranaire lésée constitue donc un indice important dans l'identification des composants de la machinerie protéique de réparation. Nous avons étudié la localisation subcellulaire de l'AnxA5 dans des myoblastes et myotubes endommagés par irradiation laser ou par traitement à la SLO. Pour y parvenir, nous avons utilisé plusieurs approches expérimentales. Nous avons étudié la localisation subcellulaire de l'AnxA5 endogène par immunocytofluorescence, étudié

son trafic par utilisation de la protéine de fusion EGFP-AnxA5 et étudié également le comportement d'AnxA5 extracellulaire couplé à un fluorophore.

B1. Cas des ruptures mécaniques par irradiation laser

B1.a. Localisation de l'Annexine-A5 endogène

Nous avons étudié la localisation de l'AnxA5 endogène après rupture mécanique de la membrane plasmique des myoblastes et des myotubes de la lignée LHCN-M2. La rupture du sarcolemme par irradiation laser est réalisée sur quelques cellules parmi des dizaines de milliers au cours d'une expérience. Analyser la distribution subcellulaire d'une protéine endogène par immunocytofluorescence requiert donc le repérage très précis des cellules endommagées. Pour cela nous avons utilisé des outils développés pour la microscopie corrélative. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de Petri à fond en verre équipées d'une lamelle quadrillée contenant un code alphanumérique dans chaque case. Les cellules ont été irradiées en présence de 1mM Ca^{2+} selon les paramètres décrits précédemment, mais, dans ce cas, en absence de FM1-43 afin d'éviter des problèmes de parasitage de l'émission de fluorescence associée à l'immunomarquage de l'AnxA5. Nous avons étudié la localisation de l'Anx-A5 endogène pour deux intervalles de temps moyens entre l'irradiation laser et la fixation : 7 minutes et 28 minutes.

Pour 50% des myoblastes LHCN-M2, observés 7 minutes après le dommage membranaire, de l'Anx-A5 s'est accumulée au niveau de la zone de rupture de la membrane plasmique (**Figure 3.4A, flèche**). Sur l'autre moitié des myoblastes, nous n'avons pas observé d'accumulation spécifique d'AnxA5 au niveau de la zone de rupture (**Figure 3.4B, flèche**). De la même façon, pour un intervalle moyen de 28 minutes entre la rupture membranaire et la fixation des myoblastes, nous avons observé pour 50% des cellules, une accumulation d'Anx-A5 au niveau de la zone de rupture (**Figure 3.4C, flèche**) et 50% non (**Figure 3.4D, flèche**). Dans les myoblastes endommagés, nous avons systématiquement observé une délocalisation de l'Anx-A5 nucléoplasmique vers l'enveloppe nucléaire, suggérant une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule, avec une concentration approchant ou atteignant le mM dans le noyau (**Figure 3.4A-D, ***).

Pour la majorité des myotubes endommagés (85%), nous avons observé que l'AnxA5 se concentre exactement au site de rupture 7 minutes après irradiation (**Figure 3.4E, flèche**). L'agrégat formé par l'AnxA5 semble plus dense que dans le cas des myoblastes. L'intensité de fluorescence plus faible autour de la zone dense en AnxA5 suggère un recrutement local en AnxA5 cytosolique. Comme pour les myoblastes, la présence d'AnxA5 au niveau du site de rupture n'a pas été systématique. 15% des myotubes fixés 7 minutes après le dommage membranaire n'ont pas montré une accumulation spécifique d'AnxA5 (**Figure 3.4F, flèche**). Pour des myotubes fixés 28 minutes après irradiation, nous avons observé dans la majorité des cas (70%) l'absence d'AnxA5 au niveau du site de rupture (**Figure 3.4H, flèche**).

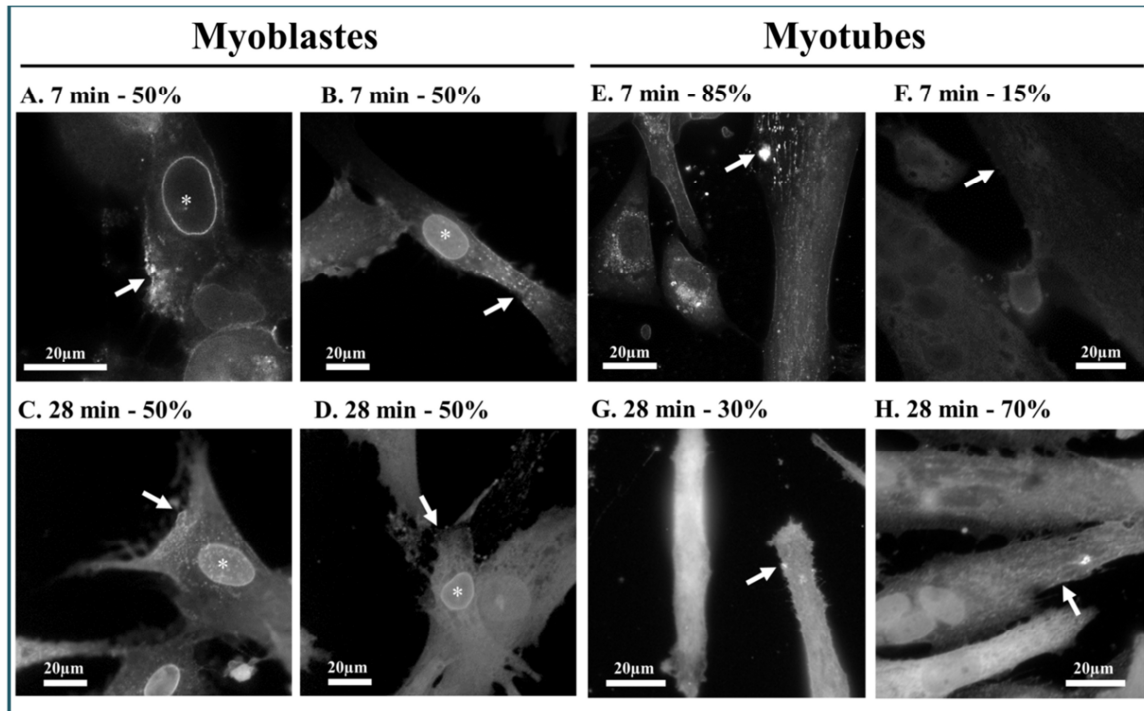


Figure 3.4 : Distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les myoblastes et myotubes LHCN-M2 endommagés par irradiation laser. Les myoblastes (A à D) et myotubes (E à H) ont été irradiés avec un laser d'une puissance de 110mW (+/- 5mW) en présence de 1mM Ca^{2+} . Après irradiation, les cellules ont été fixées au méthanol pendant 5 min à -20°C puis immunomarquées pour l'AnxA5 (blanc). Deux intervalles de temps entre l'irradiation et la fixation sont présentés : 7 minutes (A, B, E et F) et 28 minutes (C, D, G et H). La valeur en pourcentage indique la proportion de cellules répondant comme la cellule présentée sur l'image. Dans 50 % des cas, l'AnxA5 est recrutée au niveau de la zone de rupture des myoblastes. Elle est systématiquement recrutée au niveau de l'enveloppe nucléaire des myoblastes. Le noyau des myoblastes endommagés est marqué par un astérisque (*). 7 minutes après le dommage membranaire, la majorité des myotubes (70%) ont une accumulation forte d'AnxA5 au site de rupture. En revanche 28 minutes après le dommage membranaire, l'AnxA5 est retrouvée au niveau de la zone de rupture que dans 30% des myotubes.

Cette chute de la proportion de cellules marquées pour l'AnxA5 au site de rupture suggère que l'AnxA5 est « éliminée » de la zone endommagée au cours du temps, sans savoir si elle est rejetée dans le milieu extracellulaire ou restituée au cytoplasme.

Si la méthode utilisée a l'avantage de pouvoir visualiser l'AnxA5 endogène, naturellement présente dans les cellules, elle ne renseigne sur la localisation subcellulaire de la protéine d'intérêt que plusieurs minutes après le dommage. En effet l'intervalle minimum entre le dommage et la fixation des cellules est de 7 minutes correspondant aux 2 minutes de manipulation des cellules après irradiation sous le microscope et aux 5 minutes de fixation. L'absence d'AnxA5 au site de rupture dans un grand nombre de cellules s'explique probablement par la longueur de cet intervalle de temps au cours duquel différents événements peuvent conduire au départ de l'AnxA5. Nous avons néanmoins observé une accumulation d'AnxA5 pour la majorité des myotubes LHCN-M2, au niveau du site de rupture, ce qui suggère que l'AnxA5 est impliquée directement ou indirectement dans le(s) mécanisme(s) de réparation des dommages membranaires mécaniques.

Résultats et conclusions

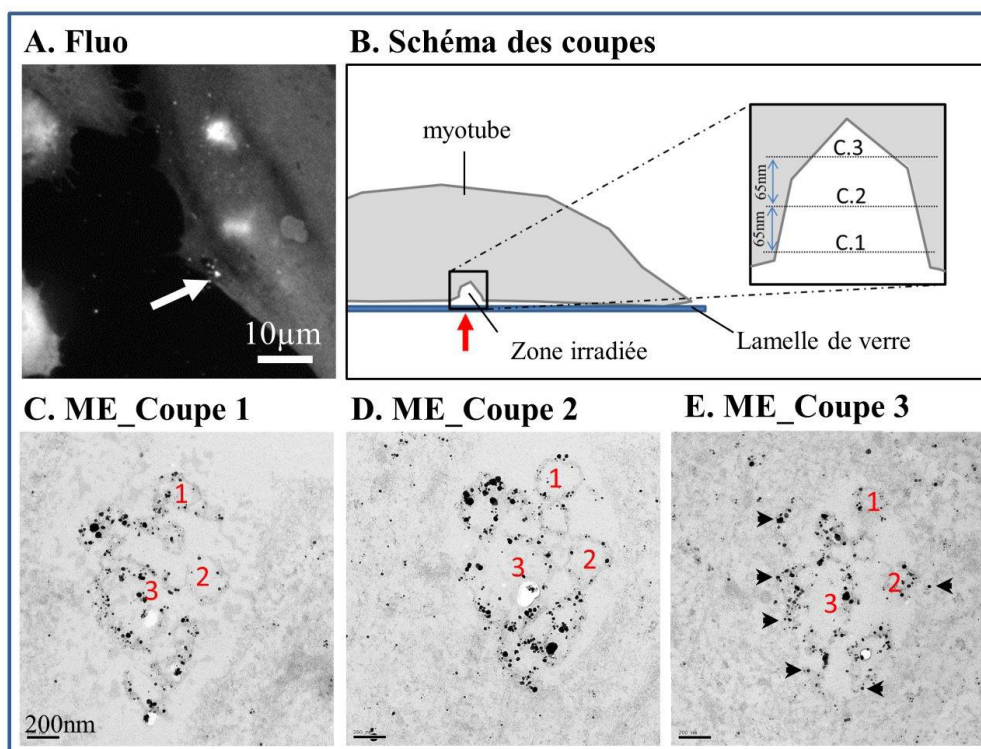


Figure 3.5 : Analyse de la distribution subcellulaire de l'AnxA5 endogène par microscopie électronique, dans les myotubes LHCN-M2 endommagés par irradiation laser. Un myotube LHCN-M2 a été irradié et immunomarké comme indiqué dans la légende de la Figure 3.4. Après irradiation, les cellules ont été fixées au glutaraldéhyde 1% pendant 10 min à température ambiante, puis immunomarkées pour l'AnxA5 à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la fois à l'Alexa-488 et à des particules d'or, permettant son observation en microscopie de fluorescence (A) et en microscopie électronique à transmission (C à E). L'intervalle de temps entre l'irradiation et la fixation est de 7 minutes. (A) La cellule endommagée a été observée en microscopie de fluorescence. 7 minutes après le dommage membranaire, une forte accumulation d'AnxA5 (blanc) est visible au site de rupture (flèche). (B) Schéma des plans de coupe. Des coupes de différentes profondeurs, contenant la zone endommagée, ont été collectées à partir des cellules incluses en résine. La flèche rouge indique le sens de l'irradiation laser : les cellules adhérentes sur une lamelle de verre sont irradiées par le dessous à l'aide d'un microscope inversé. L'encart représente un schéma de la zone endommagée avec la position des trois coupes (C.1 à C.3) analysées en C, D et E, respectivement. La distance entre chaque coupe successive est d'environ 65 nm. (C à E) Images en microscopie électronique à transmission (ME), à fort grossissement, de la zone irradiée selon les trois coupes décrites en B. Les numéros en rouge indiquent la position de trois vésicules. Ils permettent de se repérer sur les trois coupes. La coupe 1, qui correspond à la zone la plus proche de l'interface lamelle/cellule, montre une large ouverture dans la membrane. Le site de rupture contient du matériel membranaire marqué par l'AnxA5 (grains noirs). La coupe 2 permet d'observer la présence de vésicules lipidiques marquées par l'AnxA5. Les vésicules sont de taille variable. La vésicule n°3, très large, pourrait correspondre à la fusion de plusieurs vésicules. Sur la coupe 3, qui présente une zone plus profonde dans la cellule, on observe des molécules d'AnxA5 liées à la membrane, sur les bords du site de rupture (têtes de flèches).

Pour observer la distribution subcellulaire de l'AnxA5 au site de rupture, à plus forte résolution, une expérience similaire a été réalisée, en utilisant un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa-488 et des particules d'or. Cet anticorps permet de corréler les observations en microscopie de fluorescence avec des observations en microscopie électronique à transmission. 7 minutes après un dommage membranaire par irradiation laser,

nous avons vérifié la présence d'AnxA5, accumulée au site de rupture d'un myotube LHCN-M2, par microscopie de fluorescence (**Figure 3.5A**). Le site de rupture a ensuite été observé par microscopie électronique à transmission selon différents plans de coupes (**Figure 3.5B**). La zone la plus proche de l'interface cellule/support, montre une ouverture large du sarcolemme, dans laquelle est présente du matériel membranaire associé à de l'AnxA5 (**Figure 3.5C, grains noirs**). Une coupe intermédiaire montre la présence, dans cette ouverture, de vésicules lipidiques exposant de l'AnxA5 à leur surface (**Figure 3.5D**). La taille des vésicules est très variable. Certaines grandes vésicules pourraient résulter d'un processus de fusion (**Figure 3.5D, n°3**). Sur la coupe la plus profonde, nous avons observé une ouverture de diamètre plus faible, suggérant la constriction de la rupture (**Figure 3.5E**). Cette constriction aboutit probablement à la fermeture complète de la membrane sur des zones plus profondes. Sur cette coupe l'AnxA5 apparaît à la fois associée à du matériel membranaire dans la lumière du site endommagé, mais également en interaction avec la membrane plasmique sur les bords du site de rupture (**Figure 3.5E, têtes de flèches**). Ces résultats indiquent, tout d'abord, que le dommage du sarcolemme conduit à une accumulation de vésicules lipidiques au site de rupture. Ces vésicules associées les unes aux autres pourraient constituer le « patch » lipidique permettant de colmater la rupture. Ces résultats indiquent également que l'AnxA5 se lie aux bords de la zone de rupture, comme proposé dans le modèle de réparation des cellules périvasculaires murines (Bouter et al., 2011). Ils indiquent, enfin, de façon tout à fait originale, que l'AnxA5 est également liée à la surface des vésicules lipidiques s'accumulant dans la lumière de l'ouverture du sarcolemme.

Afin de pouvoir étudier plus en détail le comportement de l'AnxA5 au cours des premières secondes suivant la lésion membranaire, nous avons décidé d'étudier des cellules exprimant une protéine de fusion EGFP-AnxA5.

B1.b. Suivi de l'EGFP-Annexine-A5

Les myoblastes et myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec un plasmide pDEST14 dans lequel la séquence codant l'AnxA5 humaine a été fusionnée à la protéine fluorescente EGFP. La protéine résultant de l'expression de cette construction est une AnxA5 à laquelle est accrochée sur sa partie N-Terminale une protéine fluorescente EGFP (**Figure 3.6**).

Nous avons observé que la rupture du sarcolemme des myoblastes conduit à un recrutement de l'AnxA5 aux alentours du site irradié en quelques secondes (**Figure 3.7A, +1.6s**). Rapidement ce marquage membranaire localisé laisse place à un marquage vésiculaire réparti dans toute la cellule (**Figure 3.7A, +25.6s**). Enfin, environ 30s après la rupture, nous avons observé une délocalisation de l'AnxA5 nucléoplasmique vers l'enveloppe nucléaire (**Figure 3.7A, +40s**). La présence d'AnxA5 à l'enveloppe nucléaire traduit une entrée massive et profonde de Ca^{2+} dans les myoblastes.

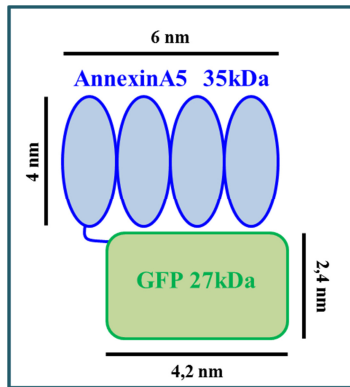


Figure 3.6 : Représentation schématique de la protéine de fusion EGFP-Annexine-A5. « L'Enhanced Green Fluorescent Protein » (EGFP) recombinante a été fusionnée à la partie N-Terminale de l'AnxA5 recombinante humaine. La protéine résultante de cette fusion a une masse moléculaire de 62kDa (68% plus grande que l'AnxA5 seule) et un encombrement stérique plus important que l'AnxA5.

Cette entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule, subséquente à l'absence de réparation membranaire, est probablement à l'origine du faible recrutement de l'AnxA5 au site de rupture. En effet, le flux calcique entrant est plus rapide que la diffusion de l'AnxA5 (et d'autant plus de l'EGFP-AnxA5) vers le site de rupture. L'AnxA5 cytoplasmique au contact de Ca^{2+} à une concentration de l'ordre du mM se retrouve alors piégée, en interaction avec des vésicules exposant des PS.

Dans les myotubes, l'EGFP-AnxA5 est recrutée dès les premières secondes après rupture de la membrane plasmique (**Figure 3.7B, +6.4s, flèche**). Cet assemblage d'AnxA5 augmente en taille et en intensité durant une trentaine de secondes (**Figure 3.7B, +40s, flèche**) puis se stabilise pendant une quarantaine de secondes avant de se désassembler (**Figure 3.7B, + 136s, flèche**). L'accumulation d'EGFP-AnxA5 au niveau du site de rupture est moins intense que celle observée pour l'AnxA5 endogène (**Figure 3.4E**), probablement du fait que l'EGFP-AnxA5 est en compétition avec l'AnxA5 endogène pour l'interaction avec la membrane endommagée. Or, les dimensions nettement supérieures de l'EGFP-AnxA5 limitent sa diffusion comparée à l'AnxA5 endogène.

Nos résultats montrent que l'EGFP-AnxA5 est rapidement mobilisée au site de rupture des myotubes endommagés et que cette accumulation d'AnxA5 est « éliminée » dès que la membrane plasmique est réparée (70s, cf **Figure 2.4**). Le manque de résolution de la technique ne permet pas d'établir si l'AnxA5 est rejetée dans le milieu extracellulaire ou restituée au cytoplasme.

B1.c. Suivi d'Annexine-A5 extracellulaire fluorescente

Plusieurs études ont rapporté l'existence d'AnxA5 dans le milieu extracellulaire ((Flaherty et al. 1990), (Tait et al. 1988), (Krikun et al. 1994), (Römissh et al. 1992), (Kaneko et al. 1996), (Masuda et al. 2004)). Afin d'analyser le comportement de l'AnxA5 extracellulaire au cours de la rupture membranaire des myotubes LHCN-M2, les cellules ont été irradiées en présence d'AnxA5 extracellulaire conjuguée au fluorochrome Cyanine-3 (AnxA5-Cy3).

Immédiatement après la rupture, nous avons observé un recrutement d'AnxA5-Cy3 exactement au niveau de la zone de rupture (**Figure 3.8, +1,6s**).

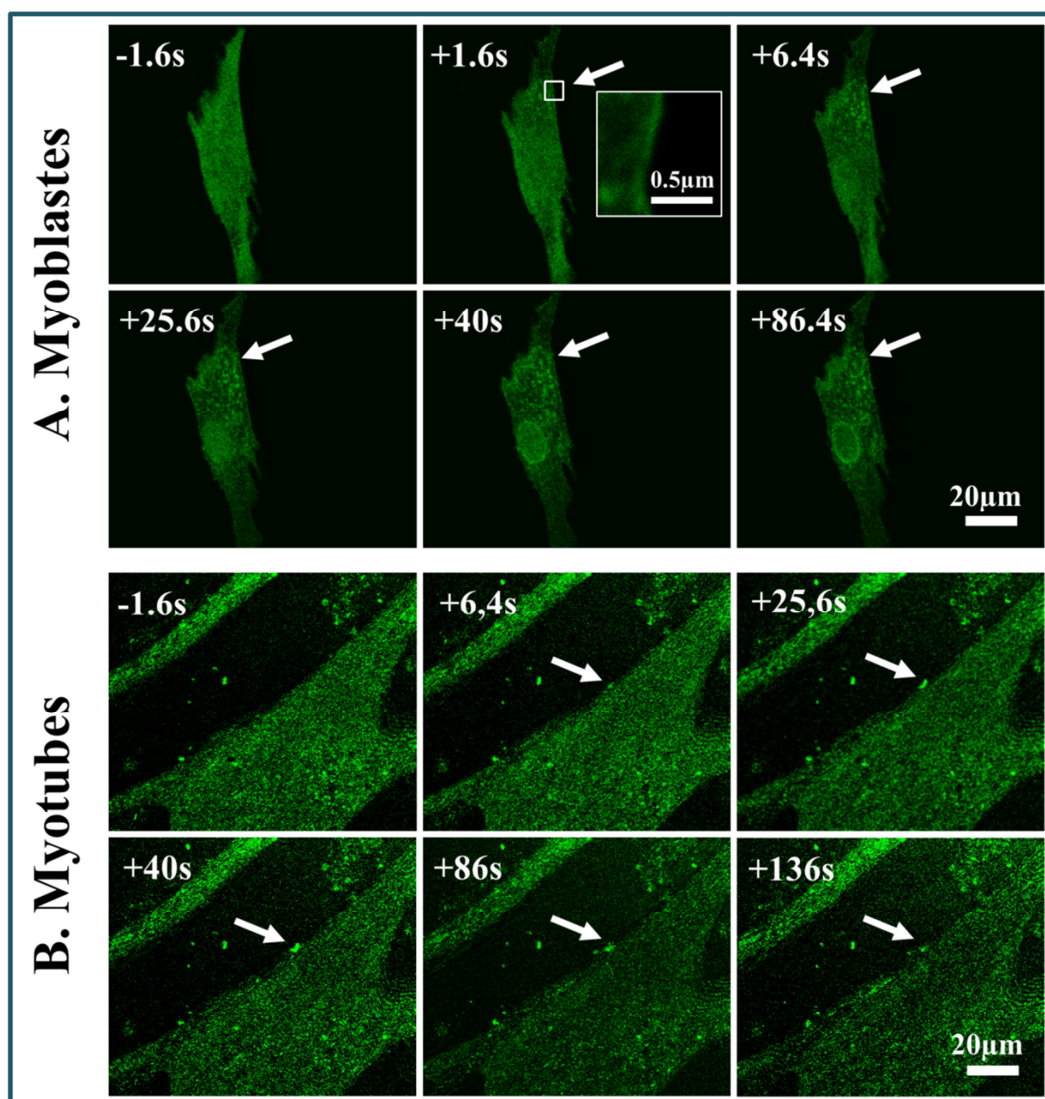


Figure 3.7 : Trafic subcellulaire de l'EGFP-Annexine-A5 lors d'un dommage membranaire dans les myoblastes et les myotube LHCN-M2. Les cellules transfectées par le plasmide pDEST14-EGFP-AnxA5 ont été irradiées avec un laser d'une puissance de 110 (+/- 5) mW en présence de 1mM Ca^{2+} . L'EGFP-AnxA5 (vert) a été imagée avant (-1,6s) et après l'irradiation laser pendant environ 2,5 minutes. Les flèches blanches indiquent la zone membranaire irradiée. Les temps correspondent aux délais après irradiation laser. Sur l'image du myoblaste à 1.6s après l'irradiation laser, l'encart montre un grossissement de la zone encadrée en blanc sur l'image. Dans les myotubes, l'EGFP-AnxA5 est recrutée au niveau du site de rupture en quelques secondes. L'agrégat d'AnxA5 augmente pendant environ 40 secondes, suggérant un recrutement continu d'AnxA5, puis se désagrège.

Ce recrutement s'est poursuivi durant environ 30 secondes (**Figure 3.8, +30,4s**) puis la taille de l'assemblage a diminué significativement (**Figure 3.8, +155s**). Ces résultats indiquent que l'AnxA5 extracellulaire est capable également de se lier en quelques secondes au sarcolemme

endommagé. Comme l'AnxA5 endogène, elle est libérée du site de rupture dès la réparation membranaire réalisée. Cette expérience ne permet pas, encore une fois, de déterminer si elle est rejetée dans le milieu extracellulaire ou internalisée dans le cytoplasme. Nous pouvons

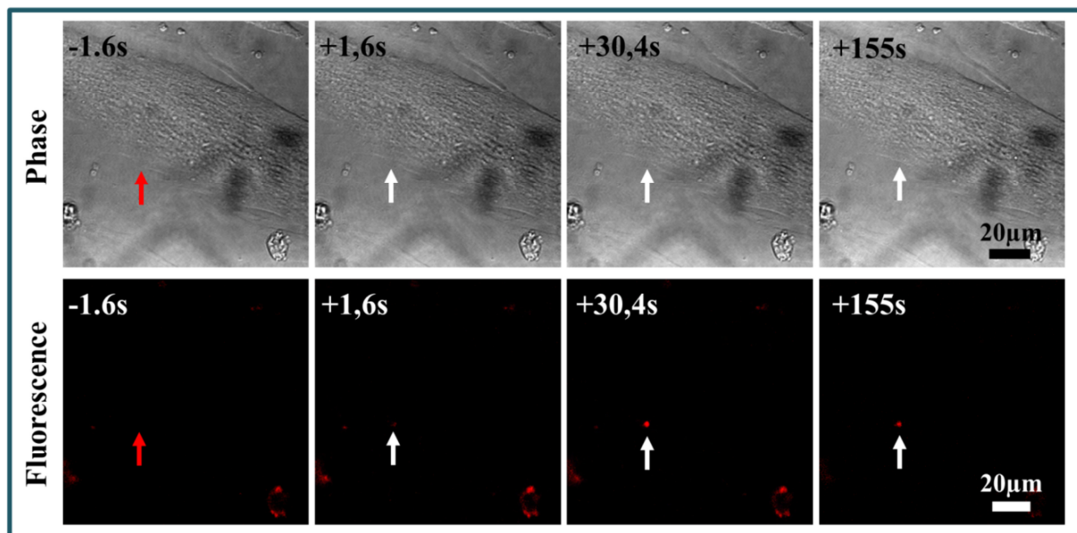


Figure 3.8 : Localisation de l'Annexine-A5-Cy3 extracellulaire après rupture de la membrane plasmique des myotubes de la lignée LHCN-M2 par irradiation laser. Les myotubes ont été irradiés en présence de 5µg/mL d'AnxA5-Cy3 et de 1mM Ca^{2+} et observés simultanément en microscopie à contraste de phase (ligne du haut) et de fluorescence (ligne du bas). La zone irradiée est indiquée avec une flèche rouge avant irradiation et une flèche blanche après irradiation. Les temps indiqués correspondent au temps en secondes avant (-) et après (+) irradiation, respectivement. Dès la première seconde suivant la rupture de la membrane, l'AnxA5-Cy3 extracellulaire est mobilisée à la zone de rupture où elle s'accumule pendant une trentaine de secondes avant d'être « éliminée ».

conclure qu'en se liant à la zone de rupture dans les toutes premières secondes après un dommage membranaire mécanique, l'AnxA5 extracellulaire, comme l'AnxA5 endogène, pourrait jouer un rôle dans la réparation du sarcolemme.

B2. Cas des perforations membranaires par la SLO

Afin d'étudier le comportement de l'AnxA5 pour des dommages membranaires variés, nous avons ensuite analysé sa distribution subcellulaire et son trafic lors de traitement des cellules par la SLO. Des approches expérimentales identiques à celles utilisées pour l'étude des ruptures mécaniques ont été employées.

B2.a. Localisation de l'Annexine-A5 endogène

Nous avons tout d'abord analysé la distribution subcellulaire de l'AnxA5 endogène par immunocytofluorescence dans des myotubes LHCN-M2 traités à la SLO pendant 2 minutes en présence de 1mM Ca^{2+} . Dans ces conditions, nous avons observé un marquage ponctiforme de l'AnxA5 (**Figure 3.9A**). L'observation à fort grossissement montre que les assemblages

d'AnxA5, dont le diamètre est inférieur au μm , se forment majoritairement à la membrane plasmique (**Figure 3.9A**). Nous avons observé que cette distribution de l'AnxA5 était dépendante du Ca^{2+} (**Figure 3.9B**) mais également spécifique du traitement à la SLO (**Figure 3.9C**).

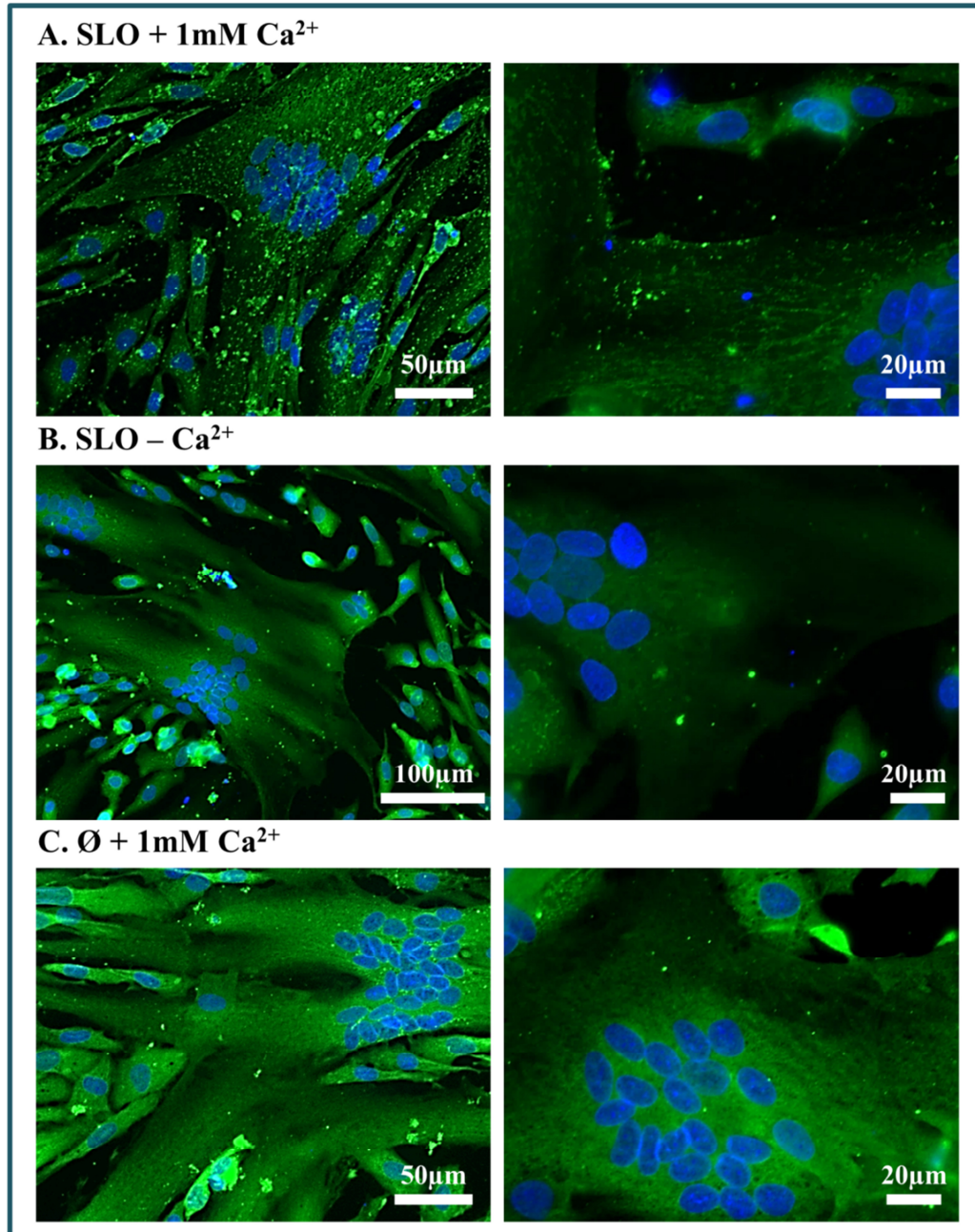


Figure 3.9 : Localisation de l'AnxA5 endogène dans les myotubes LHCN-M2 endommagés par traitement à la SLO. Les cellules ont été traitées (A et B) ou non (C) avec 300ng/mL de SLO pendant 2 min à température ambiante, en présence (A et C) ou non (B) de 1mM Ca^{2+} . Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol pendant 5 min à -20°C et immunomarquées pour l'AnxA5, comme décrit dans la légende de la Figure 3.2. Les cellules ont été observées par microscopie à épifluorescence à faible (x6.3, colonne de gauche) et à fort (x37.8, colonne de droite) grossissement. Le traitement à la SLO en présence de 1mM Ca^{2+} conduit à la formation d'agrégats d'AnxA5 à la membrane des myotubes. Pour visualiser plus facilement les différentes cellules, les noyaux ont été marqués à l'aide de DAPI.

Ces résultats indiquent que l'entrée de Ca^{2+} , subséquente à la perforation du sarcolemme des myotubes LHCN-M2 par la SLO, conduit à des recrutements localisés de l'AnxA5 endogène au sarcolemme. Même si nos expériences ne montrent pas directement une co-localisation entre les molécules de SLO et les molécules d'Anx-A5, nous pouvons postuler que les assemblages d'AnxA5 se forment au niveau des pores membranaires. Ce résultat suggère que l'AnxA5 endogène pourrait jouer un rôle dans le processus d'élimination des pores formés par la SLO dans le sarcolemme.

Il faut noter que, comme dans le cas des ruptures mécaniques, la distribution subcellulaire de l'AnxA5 endogène n'est ici observé que plusieurs minutes après les dommages membranaires induits pas la SLO. Il faut effectivement prendre en compte les 2 minutes de traitement à la SLO et les 5 minutes de fixation au méthanol. Afin d'appréhender la cinétique des différents événements se déroulant au cours de la perforation membranaire avec la SLO, nous avons réalisé le même type d'expérience sur des myotubes transfectés exprimant l'EGFP-AnxA5.

B2.b. Suivi de l'EGFP-Annexine-A5

Pour cette expérience, les myotubes LHCN-M2 transfectés par le plasmide pDEST14-EGFP-AnxA5 ont été incubés avec 300ng/ml de SLO en présence de 1 mM Ca^{2+} et immédiatement imagés par microscopie de fluorescence. Nous avons observé l'apparition d'agrégats d'EGFP-AnxA5 dès la première minute après l'ajout de SLO (**Figure 3.10, +60, flèches blanches**). 2 minutes et 30 secondes après l'ajout de SLO, nous avons observé une délocalisation totale de l'EGFP-AnxA5, qui se retrouve alors accumulé sous forme d'un ensemble de petits amas répartis dans toute la cellule (**Figure 3.10, +150s**).

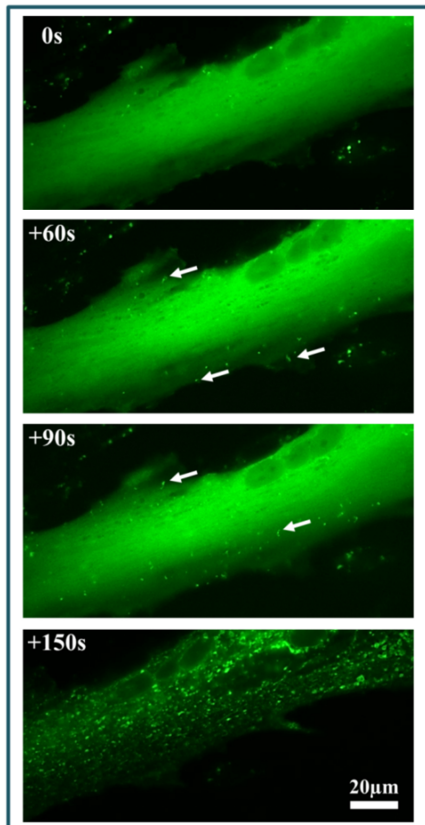


Figure 3.10 : Localisation subcellulaire de l'EGFP-Annexine-A5 dans les myotubes LHCN-M2 en présence de SLO. Les myotubes LHCN-M2 transfectés par le plasmide pDEST14-EGFP-AnxA5 ont été incubés avec 300ng/ml de SLO en présence de 1 mM Ca^{2+} et immédiatement imagés par microscopie de fluorescence. Des images ont été acquises au moment de l'ajout de SLO (0s) puis toutes les 30s. A partir de 1 min après ajout de la SLO, on observe la formation de multiples assemblages d'EGFP-AnxA5 au sarcolemme. La formation de ces assemblages est hautement dynamique : ils se forment et disparaissent en quelques dizaines de secondes. 2,5 minutes après l'ajout de la SLO, l'EGFP-AnxA5 est exclusivement sous forme d'assemblages.

Observés à fort grossissement, les assemblages d'EGFP-AnxA5 apparaissent comme des extensions tubulaires, se formant à partir du sarcolemme en direction du milieu extracellulaire (**Figure 3.11, flèches blanches**). La distribution de l'EGFP-AnxA5 dans ces extensions apparaît polarisée, avec une accumulation plus forte à l'extrémité apicale de la structure tubulaire (**Figure 3.11, têtes de flèche**). Afin de déterminer la nature membranaire, ou non, de ces extensions, des myotubes non-transfectés ont été traités à la SLO pendant 2min en présence de 1 mM Ca^{2+} , puis incubés avec 5 $\mu\text{g/ml}$ de FM1-43. Dans ces conditions, nous

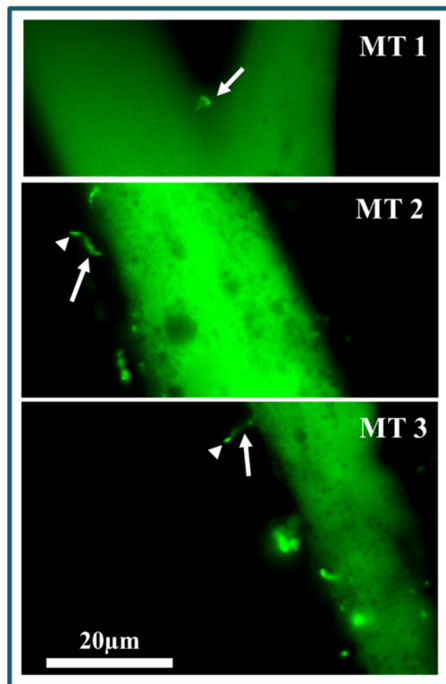


Figure 3.11 : Formation d'extensions tubulaires riche en EGFP-AnnexineA5 à la surface des myotubes traités à la SLO. Images représentant 3 myotubes (MT 1 à 3) exprimant l'EGFP-AnxA5 et traités à la SLO environ 90s. Les myotubes présentent des extensions membranaires (flèches blanches) contenant à leur extrémité une accumulation d'EGFP-AnxA5 (têtes de flèche). Certaines extensions peuvent atteindre une longueur de 8 μm (MT2, flèche blanche).

avons observé le marquage des extensions tubulaires indiquant la nature membranaire de ces structures (**Figure 3.12, flèches**). Le traitement à la SLO conduit donc à un recrutement de l'AnxA5 au sarcolemme, probablement au niveau des pores membranaires. En réponse à ce traitement, le sarcolemme bourgeonne au niveau des sites membranaires où s'accumule l'AnxA5. Ce mécanisme de bourgeonnement est probablement le processus mis en place par le myotube pour éliminer les pores membranaires, comme observé pour les cellules HEK293 (E. B. Babiychuk et al. 2009). Pour le vérifier, il est indispensable de localiser les pores membranaires, en utilisant par exemple de la SLO fluorescente.

C. Conséquence de la diminution de l'expression d'Annexine-A5 endogène sur la réparation membranaire des myotubes LHCN-M2 :

Afin d'analyser les conséquences éventuelles d'une déficience en AnxA5 endogène pour la réparation membranaire des myotubes LHCN-M2, nous avons utilisé une approche basée sur la transduction des cellules par des particules lentivirales qui contiennent un plasmide intégratif exprimant une séquence shARN ciblant l'ARNm de l'AnxA5.

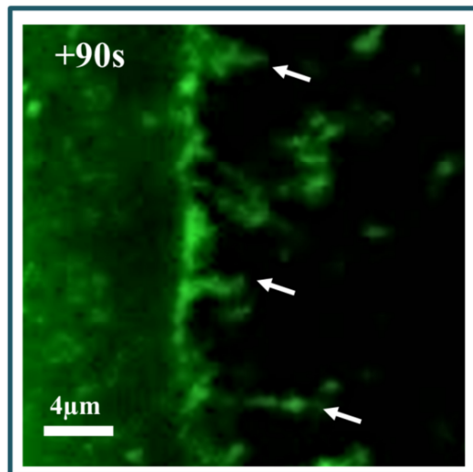


Figure 3.12 : Formation d'extensions membranaires à la surface des myotubes traités à la SLO. Image à fort grossissement du sarcolemme d'un myotube traité à la SLO pendant 90s, en présence de Ca^{2+} , puis incubé en présence de 5 µg/ml de FM1-43. Le marquage au FM1-43 des extensions tubulaires (flèches) confirment la nature membranaire de ces structures.

La production de ces particules lentivirales a été réalisée par la plateforme de vectorologie de Bordeaux (Véronique Guyonnet Dupérat et Alice Vimeney, INSERM U1035, Université de Bordeaux). Les myotubes LHCN-M2 déficients en AnxA5 ont ensuite été soumis à des ruptures mécaniques par irradiation laser ou soumis à un traitement à la SLO. En guise de contrôle, les myoblastes ont été transduits par des particules lentivirales contenant un plasmide exprimant une séquence ARNsh aspécifique de leur génome. Pour simplifier la lecture, les particules lentivirales contenant le plasmide exprimant la séquence ARNsh ciblant l'ARNm de l'AnxA5 ont été abrégées ci-dessous en particules A5-shARN, et celles contenant la séquence aspécifique, particules contrôles.

C1. Knock-down de l'expression de l'Annexine-A5 endogène

Plusieurs stratégies ont été employées afin d'établir des myotubes LHCN-M2 déficients en AnxA5. Nous avons tout d'abord tenté de transduire des myoblastes LHCN-M2 avec les particules A5-shARN et, de façon subséquente, d'induire la différenciation/fusion des myoblastes en myotubes. Nous avons observé, par western-blot, que le contenu en AnxA5 endogène des myoblastes ainsi traités chute de 80 (± 5) %, comparé aux myoblastes transduits avec les particules contrôles (**Figure 3.13A**). Nous avons estimé que la concentration résiduelle en AnxA5 dans les myoblastes traités est alors en moyenne de 1.2 (± 0.05) ng/µg de protéines totales. L'analyse par immunocytofluorescence montre que toute la population de myoblastes

transduits est affectée par la baisse en AnxA5, mais que les cellules expriment des taux résiduels variables (**Figure 3.13B, A5-shARN**). De façon remarquable, nous avons observé que les myoblastes LHCN-M2 déficients en AnxA5 étaient incapables de fusionner même après 6 jours en condition de différenciation (images non montrées). Cette observation indique que l'AnxA5 pourrait jouer un rôle dans la différenciation et/ou la fusion des myoblastes squelettiques humains, comme il a été proposé pour les myoblastes murins (Leikina et al. 2013). Nous avons donc dû nous résoudre à transduire directement les myotubes LHCN-M2 avec les particules A5-shARN. Nous avons observé par immunocytofluorescence que le contenu en AnxA5 endogène des myotubes transduits par les particules A5-shARN chute en moyenne de 70 (± 5) % (**Figure 3.13C, A5shARN**)

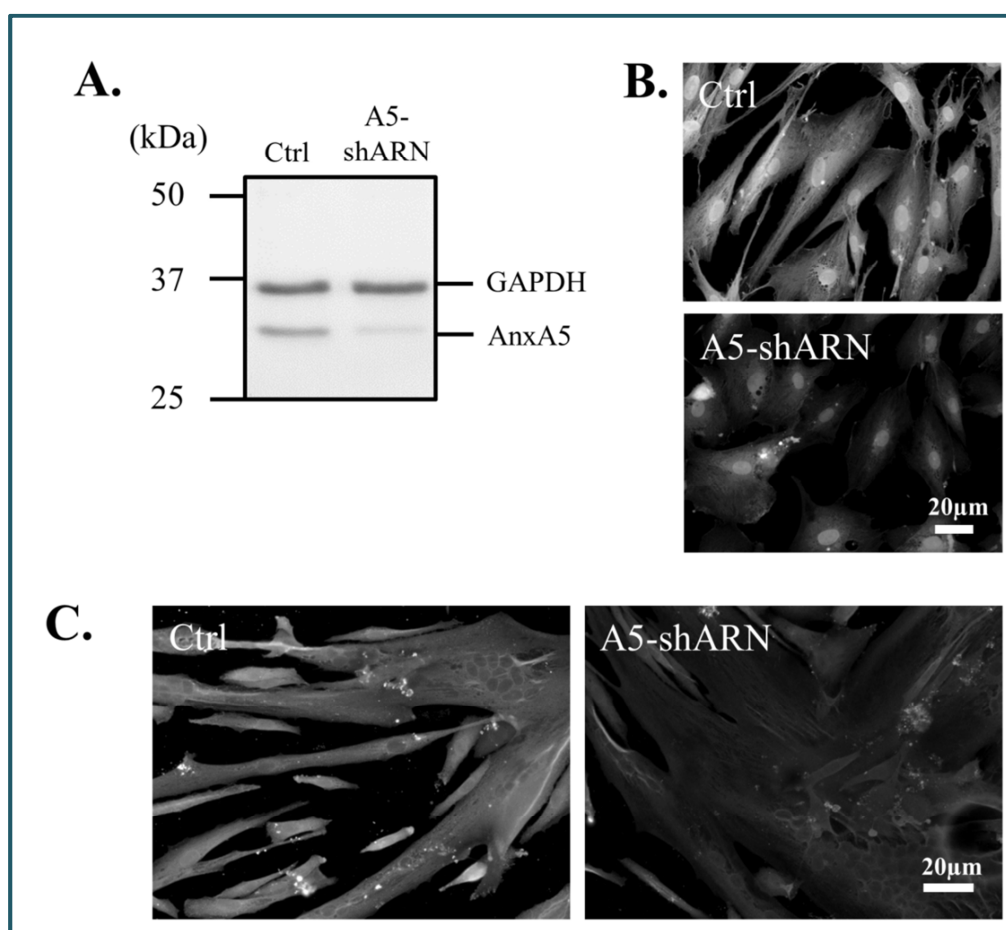


Figure 3.13 : Atténuation de l'expression de l'Annexine-A5 endogène par transduction lentivirale dans les myoblastes et myotubes LHCN-M2. Les myoblastes et myotubes (J3) LHCN-M2 ont été transduits par des particules lentivirales contenant une séquence shARN ciblant l'AnxA5 (A5-shARN). Les expériences contrôles (ctrl) ont été réalisées par transduction à l'aide de particules lentivirales contenant une séquence shARN aspécifique. Les myoblastes ont été analysés soit par western-blot (A) soit par immunocytofluorescence (B). Pour le western-blot, L'AnxA5 a été détectée avec un anticorps monoclonal de souris à partir de 10µg d'extraits protéiques totaux. La protéine GAPDH a été utilisée comme témoin de charge. Les myotubes ont été analysés par immunocytofluorescence (C). Les immunocytofluorescences des myoblastes (B) et myotubes (C) ont été réalisées comme décrit dans la légende de la Figure 3.2. La quantification de la fluorescence intracellulaire a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

C2. Cas des ruptures mécaniques par irradiation laser

Les myotubes LHCN-M2 déficients en AnxA5 ont été soumis à une rupture de leur sarcolemme par irradiation laser, en présence de 1mM Ca^{2+} . Nous avons observé deux types de réponses. La plupart des myotubes irradiés (85%) montrent une entrée forte de FM1-43 (**Figure 3.14, ligne du haut**), caractérisée par une augmentation importante et continue de l'intensité de fluorescence intracellulaire (**Figure 3.15, cercles pleins**). Ce résultat indique que ces cellules sont incapables de réparer leur sarcolemme. Les 15% de cellules restantes (**Figure 3.14, ligne du bas et Figure 3.15, cercles vides**) se comportent comme des myotubes non-transduits (**Figure 2.4, cercles pleins**) ou comme des myotubes transduits par les particules contrôles (**Figure 3.15, cercles bleus**), avec une entrée de FM1-43 limitée à une zone proche de la membrane plasmique et une cinétique d'intensité de fluorescence intracellulaire atteignant une phase de plateau après environ 70s. Le fait que 15% des myotubes au sein de la population de cellules transduites maintiennent des capacités de réparation membranaire est probablement associé au fait que le taux de transduction des cellules n'est pas de 100% et certaines cellules conservent une concentration résiduelle d'AnxA5 suffisante pour assurer la réparation membranaire. Nous avons conclu de cette expérience que l'absence d'AnxA5 endogène conduit à un défaut de réparation membranaire dans les myotubes LHCN-M2 endommagés mécaniquement.

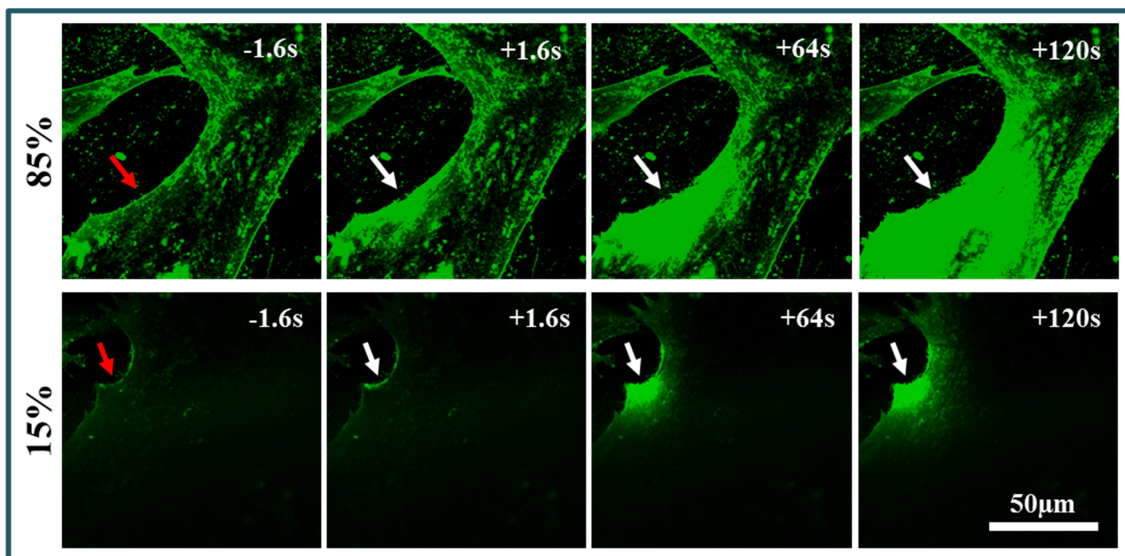


Figure 3.14 : Réponses des myotubes LHCN-M2 déficients en Annexine-A5 aux dommages membranaires par irradiation laser. Les séquences d'images sont représentatives des réponses observées pour les myotubes LHCN-M2 déficients en AnxA5 soumis à une irradiation laser d'une puissance 110mW (+/-5mW). Dans toutes les images, la zone irradiée est indiquée avec une flèche rouge avant irradiation et une flèche blanche après irradiation. Les temps indiqués dans les cases correspondent au temps en secondes avant (-) et après (+) irradiation respectivement. Deux types de réponse ont été observés : 85% des cellules ont un défaut de réparation (ligne du haut) alors que 15% des cellules se comportent comme les cellules sauvages (ligne du bas).

Nous avons de plus observé que, parmi les myotubes n'ayant pas la capacité de réparer des ruptures mécaniques de leur membrane plasmique, 40% se déchirent après rupture. Ce résultat traduit une fragilité accrue de la membrane plasmique en absence d'AnxA5 endogène.

C3. Cas des ruptures avec perforation de la membrane par la SLO

Nous avons également étudié les conséquences de la déficience en AnxA5 endogène sur la réponse des myotubes LHCN-M2 à la perforation de la membrane par la SLO. Comme pour les expériences sur les cellules sauvages, les myotubes ont été incubés 2 minutes à température ambiante en présence de SLO, avant d'être mis en présence de FM1-43. Avec 1mM Ca^{2+} , nous n'avons pas observé d'augmentation de la fluorescence intracellulaire au cours du temps

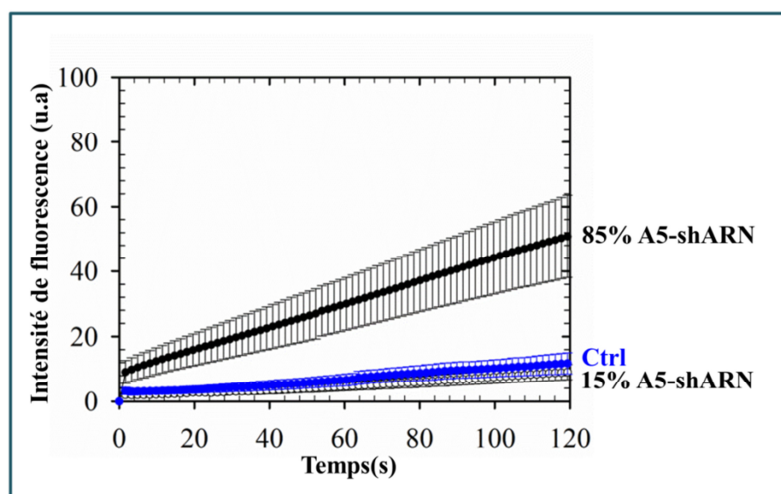


Figure 3.15 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence moyenne du FM1-43 dans les myotubes LHCN-M2 déficients en Annexine-A5 endommagés. Les données présentées correspondent aux moyennes observées pour les myotubes LHCN-M2 transduits par les particules A5-shARN (cercles pleins et vides) ou par des particules contrôles (cercles bleus). 85% des myotubes transduits par les particules A5-shARN présentent une intensité de fluorescence qui augmente continuellement (cercles pleins), indiquant une absence de réparation membranaire sur la durée d'enregistrement. 15% de ces mêmes cellules (cercles vides) se comportent comme les cellules transduites par les particules contrôles (cercles bleus), avec la présence d'un plateau environ 70s après l'irradiation laser. Ces cellules ont donc la capacité de se réparer.

pour les myotubes déficients en AnxA5 (**Figure 3.16A**), indiquant la capacité de ces cellules à éliminer les pores membranaires créés par la polymérisation et insertion de la SLO. En contrôle, nous avons réalisé cette expérience avec les mêmes cellules, en absence de Ca^{2+} (**Figure 3.16B**). Dans ce cas nous avons observé une augmentation importante de la fluorescence intracellulaire. La quantification des variations de l'intensité de fluorescence intracellulaire au cours du temps montre qu'en absence de Ca^{2+} l'intensité de fluorescence augmente de façon linéaire sur toute la durée de l'enregistrement (**Figure 3.17, cercles**

Résultats et conclusions

pleins), alors qu'en présence de Ca^{2+} l'intensité de fluorescence est maintenue à sa valeur initiale (**Figure 3.17, cercles vides**).

Nous avons donc conclu que la déficience en AnxA5 n'entrave pas le processus de réparation membranaire des myotubes LHCN-M2 endommagés par perforation avec la SLO. Il semble donc que les mécanismes qui se mettent en place dans le cas de ces perforations soient différents de ceux intervenant lors de rupture mécanique.

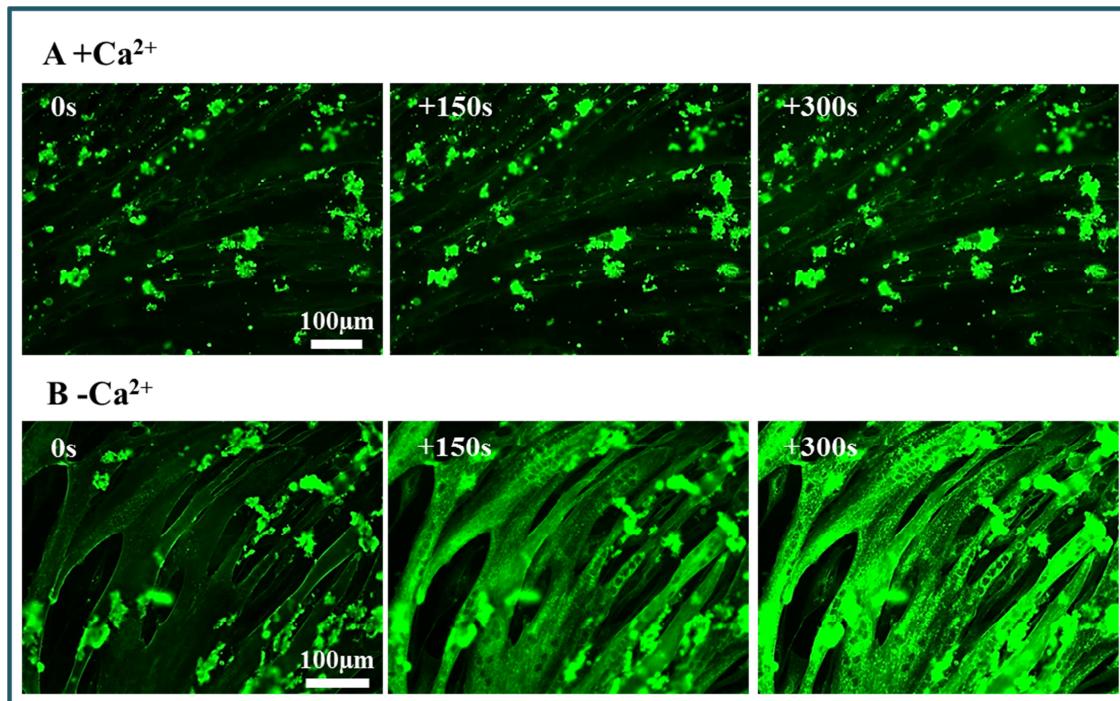


Figure 3.16 : Réponses des myotubes de la lignée LHCN-M2, sous exprimant l'Annexine-A5, aux dommages membranaires par utilisation de SLO. Les séquences d'images sont représentatives des réponses observées pour les myotubes de la lignée LHCN-M2 transduites par une séquence ARNsh anti-AnxA5, après incubation dans un tampon fait de D-PBS/- (condition sans calcium) ou D-PBS+/+ 1mM CaCl_2 (condition avec calcium) supplémenté de 10mM DTT, 20mM D-glucose en présence de 300ng/ml de SLO à température ambiante. Après incubation les cellules ont été lavées 2 fois avec du D-PBS+/+ 1mM Ca^{2+} (condition avec calcium ; première ligne) ou du D-PBS/- (condition sans calcium ; seconde ligne) et incubées dans du D-PBS/- 5µg/ml FM1-43 (condition sans calcium) ou D-PBS+/+ 5µg/ml FM1-43 1mM CaCl_2 (condition avec calcium). Les temps indiqués dans les cases correspondent au temps en secondes T0 = au moment de l'incubation en présence de FM1-43 et 150 ou 300 secondes après T0 respectivement. Les expériences ont été réalisées à l'objectif 20X.

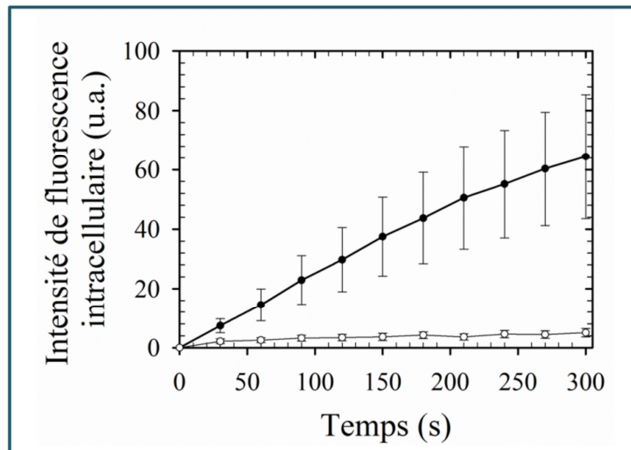


Figure 3.17 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence moyenne du FM1-43 intracellulaire des myotubes LHCN-M2 déficient en AnxA5 endommagés par la SLO. Les données présentées correspondent aux moyennes (\pm écart-type) observées pour les myotubes déficients en AnxA5 traités à la SLO en présence (cercles vides) ou en absence (cercles pleins) de $1\text{mM } Ca^{2+}$. Les cellules ont été traitées comme indiqué dans la légende de la Figure 3.15.

D. Effet de l'ajout d'Annexine-A5 extracellulaire sur la réparation membranaire des myotubes déficients en Annexine-A5 :

L'équipe a montré précédemment que l'ajout d'AnxA5 extracellulaire permettait de restaurer une capacité de réparation membranaire dans les cellules périvasculaires « knock-out » pour l'AnxA5 (Bouter et al. 2011). D'autre part, elle avait montré que l'ajout d'un mutant d'AnxA5, incapable de former des trimères et donc de réseau bidimensionnel, ne permettait pas de restaurer cette capacité de réparation. Nous avons étudié le comportement des myotubes LHCN-M2 déficients pour l'AnxA5 et endommagés par irradiation laser, en présence d'AnxA5 extracellulaire sauvage et du mutant d'AnxA5.

D1. En présence d'Annexine-A5 extracellulaire sauvage

Les myotubes déficients en AnxA5 ont été irradiés en présence de $5\mu\text{g/ml}$ de FM1-43, de $1\text{mM } Ca^{2+}$ et de $10\mu\text{g/ml}$ d'AnxA5 recombinante de rat. Dans ces conditions, nous avons observé que la courbe de cinétique des variations d'intensité de fluorescence intracellulaire du FM1-43 pour la majorité des myotubes (75%) atteignait une phase de plateau environ 70s après irradiation laser (**Figure 3.18, cercles vides**). Ce résultat indique que l'ajout d'AnxA5 extracellulaire permet de restaurer les capacités de réparation des ruptures mécaniques pour les myotubes déficients en AnxA5. Une minorité de myotubes (25%) ne répare pas leur sarcolemme avec une augmentation continue de l'intensité de fluorescence (**Figure 3.18, cercles pleins**). Néanmoins, nous avons, dans ce cas, observé une courbe avec une évolution logarithmique qui indique un ralentissement de l'entrée de FM1-43 dans les cellules au cours du temps. Ce profil de courbe est très différent de ce que nous avons observé pour les myotubes déficients en AnxA5, en absence d'AnxA5 extracellulaire (**Figure 3.14, cercles pleins**), caractérisés par une augmentation linéaire de l'intensité de fluorescence. Ce résultat indique que l'AnxA5 extracellulaire compense, au moins partiellement, le défaut d'expression de l'AnxA5 endogène dans les myotubes.

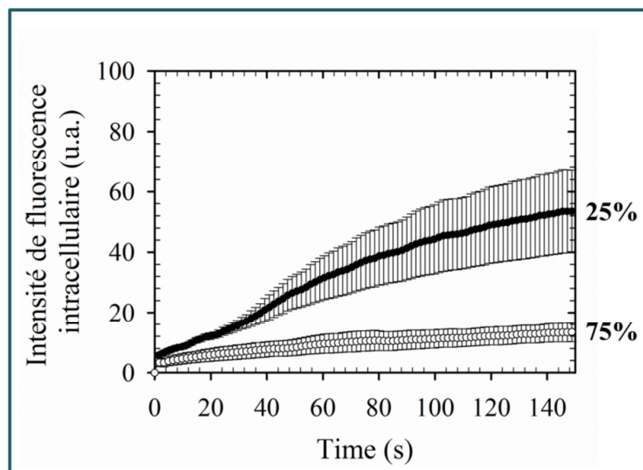


Figure 3.18 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence moyenne du FM1-43 dans les myotubes LHCN-M2 après irradiation laser en présence d'Annexine-A5 extracellulaire. Les données présentées correspondent aux moyennes (\pm l'écart-type) observées pour les myotubes LHCN-M2 déficients en AnxA5 en présence de 10 μ g/ml d'AnxA5 extracellulaire. Deux types de réponse sont observés : 25% des myotubes (cercles pleins) ont une augmentation continue de l'intensité de fluorescence, indiquant un défaut de réparation et 75% présentent une faible augmentation suivie d'un plateau environ 70s après irradiation laser (cercles vides).

D2. En présence du mutant d'Annexine-A5

En interaction avec une membrane lipidique exposant des PS, l'AnxA5 s'auto-assemble spontanément en trimères qui s'associent pour former des réseaux bidimensionnels très structurés (Pigault et al. 1994), (Mosser et al. 1991) et (Andree et al. 1992). Nous avons étudié l'effet d'un quintuple mutant d'AnxA5, incapable de s'auto-assembler en trimères pour former des réseaux bidimensionnels (Bouter et al. 2011), sur le comportement des myotubes déficients en AnxA5 et endommagés par irradiation laser. Les cinétiques des variations d'intensité de fluorescence intracellulaire se sont avérées très similaires à celles observées en absence d'AnxA5 extracellulaire (**Figure 3.14**), avec une majorité de cellules ayant une augmentation continue de l'intensité de fluorescence (83%, **Figure 3.19, cercles pleins**) et une minorité affichant un plateau environ 70s après rupture de la membrane plasmique (17%, **Figure 3.19, cercles vides**).

E. Conclusion :

Dans le cas d'une rupture mécanique du sarcolemme, les myotubes LHCN-M2 rendus déficients en AnxA5 endogène sont incapables de réparer la lésion du sarcolemme. Ce défaut de réparation peut être restauré par ajout d'AnxA5 extracellulaire, indiquant que l'AnxA5 est indispensable dans le processus de réparation membranaire. L'AnxA5 endogène, comme l'AnxA5 extracellulaire, sont spécifiquement recrutées au site de rupture, en quelques secondes et de façon dépendante du Ca^{2+} . L'AnxA5 endogène est retenue au site de rupture pendant plusieurs minutes après le dommage membranaire, probablement bien après la réparation du sarcolemme, qui, dans nos conditions expérimentales, se réalise en moyenne en 70 secondes. Etant donné que l'AnxA5 se détache de la membrane lipidique lorsque la concentration en Ca^{2+} est inférieure à 0.2 mM (Richter et al. 2005), sa présence au site de lésion plusieurs minutes après le colmatage de la rupture signifie qu'elle est piégée dans un environnement, qui restait à identifier. Les expériences de microscopie électronique montrent

Résultats et conclusions

que l'AnxA5 interagit avec des vésicules lipidiques dans la lumière de l'ouverture du sarcolemme endommagé, où la concentration en Ca^{2+} est de l'ordre du mM. Le rôle joué par l'AnxA5 ainsi exposée à la surface des vésicules lipidiques, dans le processus de réparation membranaire, reste à découvrir.

Cet agrégat d'AnxA5 endogène finit néanmoins par se désagréger, sans que nous ayons pu déterminer s'il était rejeté dans le milieu extracellulaire ou restitué au cytoplasme. Nous avons observé que l'ajout dans le milieu extracellulaire d'un mutant d'AnxA5, incapable de former de réseaux bidimensionnels, ne permet pas de restaurer la réparation membranaire des myotubes déficients en AnxA5. L'auto-assemblage de l'AnxA5 au site de rupture du sarcolemme joue probablement un rôle central dans la réparation membranaire des myotubes. Ces observations sont en accord avec le modèle proposé pour la réparation des cellules périvasculaires murines (Bouter et al. 2011). Sous l'effet de l'augmentation locale en Ca^{2+} , l'AnxA5 se lie aux PS exposées sur les bords de la région membranaire endommagée, où elle s'auto-assemble en réseaux-2D. Cette liaison aux bords de la zone de rupture a été démontrée dans cette étude, par l'analyse de la distribution subcellulaire de l'AnxA5 endogène par microscopie électronique à transmission. La formation de réseau-2D permet de rigidifier la membrane, de s'opposer aux forces de tension exercées par le cytosquelette cortical et ainsi d'empêcher la propagation de la rupture.

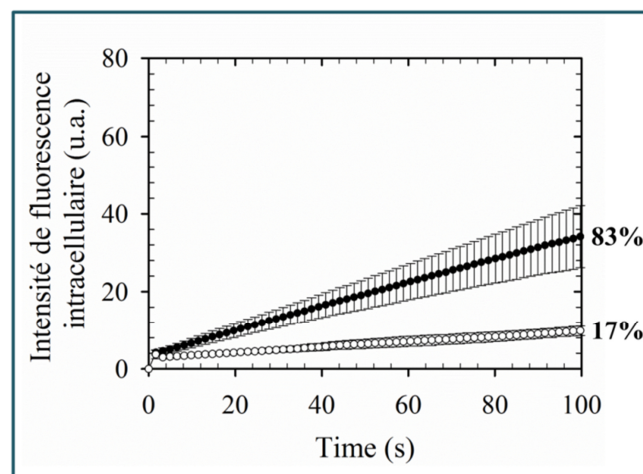


Figure 3.19 : Courbes représentant l'intensité de fluorescence moyenne du FM1-43 dans les myotubes LHCN-M2 endommagés par irradiation laser, en présence d'un mutant d'Annexine-A5 extracellulaire. Les données présentées correspondent aux moyennes (+/- l'écart-type) observées pour les myotubes LHCN-M2 déficients en AnxA5 en présence de 10 $\mu\text{g/ml}$ de mutant d'AnxA5 extracellulaire. Deux types de réponse sont observés : 83% des myotubes (cercles pleins) présentent une augmentation continue de l'intensité de fluorescence, indiquant un défaut de réparation et 17% présentent une faible augmentation suivie d'un plateau environ 70s après irradiation laser (cercles vides).

Nous avons observé que l'AnxA5 est également recrutée au sarcolemme des myotubes LHCN-M2 endommagés par exposition à la SLO, mais que la déficience en AnxA5 endogène n'empêche nullement une complète restauration de ce sarcolemme. Plusieurs hypothèses

peuvent expliquer ce résultat. La perforation par la SLO, qui conduit à des ouvertures membranaires de petites tailles et donc à des flux calciques entrants modérés, requiert peut-être l'intervention de moins d'AnxA5 endogène, comparé à la rupture mécanique. Les taux résiduels d'AnxA5 dans les myotubes transduits par les particules A5-shARN sont alors peut-être suffisants pour l'élimination des pores nucléaires. On peut également postuler que la déficience en AnxA5 est compensée par la présence d'autres Anx. En effet, il a été montré par exemple que, dans les cellules HEK293, l'AnxA6 et l'AnxA1 sont recrutées au niveau des pores formés par la SLO, où elles participent de manière complémentaire la formation de bourgeons membranaires permettant l'élimination de la SLO (Potez et al. 2011). Sans présager du rôle de l'AnxA5 dans ce processus de réparation, l'AnxA6 et l'AnxA1 pourrait tout à fait compenser son absence. La dernière hypothèse est basée sur l'existence éventuelle de mécanismes de réparation membranaire différents, dépendants du type de dommage. L'AnxA5 pourrait jouer un rôle crucial pour la réparation des ruptures membranaires mécaniques et ne pas appartenir à la machinerie protéique intervenant lors des processus de perforation par la SLO. Dans ce cas, son recrutement au sarcolemme endommagé par la SLO, comme nous l'avons observé, ne correspondrait qu'à une conséquence collatérale liée à l'entrée de Ca^{2+} .

Chapitre 4 : Comportement de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire de cellules musculaires striées squelettiques dans deux contextes pathologiques différents :

Nous avons mis en évidence que l'AnxA5 joue un rôle important dans la réparation membranaire des myotubes sains LHCN-M2 endommagés par des ruptures mécaniques. Afin d'étudier l'impact des déficiences en dysferline et en caveoline-3 sur l'AnxA5, nous nous sommes intéressés à son expression, sa localisation et son comportement après des dommages membranaires dans les contextes pathologiques caractérisant les lignées 578 (LGMD2B) et 650 (LGMD1C).

A. Cas de la lignée 578 :

Contrairement aux cellules LHCN-M2, les myotubes et les myoblastes de la lignée 578, établie à partir d'un patient atteint de LGMD2B, n'expriment pas la dysferline (cf Figure 1.11). De nombreuses études ont mis en évidence que l'altération de l'expression ou de la localisation de la dysferline peut avoir un effet sur la localisation et l'expression d'autres protéines comme la caveoline-3 (Walter et al. 2003) ou MG53 (Cai, Weisleder, Ko, Komazaki, et al. 2009a). Nous avons cherché à déterminer si l'absence de cette protéine pouvait avoir un effet sur la localisation ou le comportement de l'AnxA5 après rupture du sarcolemme.

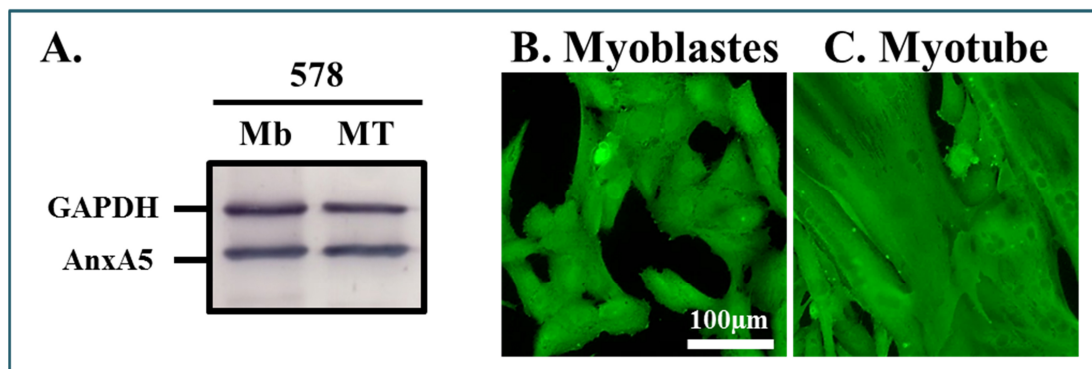


Figure 4.1 : Expression et distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les myoblastes et les myotubes 578. (A) Le contenu cellulaire en AnxA5 des myoblastes et myotubes 578 a été quantifié par western blot. 10µg d'extraits protéiques totaux de myoblastes et myotubes à J3 ont été analysés. L'AnxA5 a été détectée avec un anticorps monoclonal de souris. La protéine GAPDH a été utilisée comme témoin de dépôt. (B) et (C) Les myoblastes (B) et myotubes (C) ont été fixées 5min à -20°C avec du méthanol et marqués à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-AnxA5, 1h à température ambiante. Les complexes anticorps primaires-AnxA5 ont été mis en évidence à l'aide d'un anticorps secondaire polyclonal de chèvre conjugué au fluorochrome Alexa 488 (vert). Dans les myoblastes (B), l'AnxA5 est localisée dans le cytosol ainsi que dans le noyau. Dans les myotubes (C), l'AnxA5 est uniquement cytosolique.

A1. Expression et distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les cellules 578 intactes

Nous avons analysé, par western-blot, le taux d'expression de l'AnxA5 dans les myoblastes et myotubes 578. De façon similaire aux cellules LHCN-M2, l'AnxA5 est exprimée de manière équivalente dans les myoblastes et myotubes 578 (**Figure 4.1A**). Par comparaison avec des extraits totaux issus de cellules LHCN-M2, nous avons observé que la quantité d'AnxA5 endogène dans les cellules 578 est également de l'ordre de 10µg/ml d'extraits totaux et qu'elle possède une masse moléculaire apparente de 32kDa (données non montrées).

Nous avons ensuite analysé la distribution subcellulaire de l'AnxA5 endogène dans les myoblastes et myotubes 578 par immunocytofluorescence. Dans les myoblastes, l'AnxA5 est localisée dans le cytosol et le noyau (**Figure 4.1B**), alors qu'elle est présente uniquement dans le cytosol des myotubes (**Figure 4.1C**), comme pour la lignée LHCN-M2.

A2. Distribution subcellulaire et trafic de l'Annexin-A5 dans les cellules 578 endommagées

A2.a. Cas des ruptures mécaniques par irradiation laser

Nous avons étudié la localisation subcellulaire de l'AnxA5 endogène après rupture mécanique de la membrane plasmique des myoblastes et des myotubes de la lignée 578. Les cellules ont été irradiées en présence de 1mM Ca^{2+} et en absence de FM1-43 afin d'assurer un immunomarquage spécifique de l'AnxA5. Comme pour la lignée LHCN-M2, nous avons étudié la localisation de l'AnxA5 endogène pour deux intervalles de temps moyens entre l'irradiation laser et la fixation : 7 minutes et 28 minutes.

La majorité des myoblastes (**Figure 4.2A**) et des myotubes 578 (**Figure 4.2B**) observés 7 minutes après le dommage membranaire, montrent une accumulation d'AnxA5 endogène au niveau de la zone de rupture. Comme pour la lignée LHCN-M2, la présence de l'assemblage d'AnxA5 n'a pas été observée systématiquement. Afin de déterminer précisément la proportion de cellules présentant, ou non, cette accumulation d'AnxA5, cette expérience devra être reproduite.

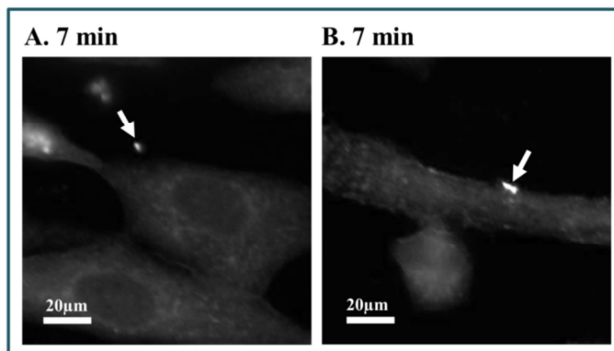


Figure 4.2 : Distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les myoblastes et myotubes 578 endommagés par irradiation laser. Les myoblastes (A) et myotubes (B) ont été irradiés avec un laser d'une puissance de 110mW (+/- 5mW) en présence de 1mM Ca^{2+} . Après irradiation, les cellules ont été fixées au méthanol pendant 5 min à -20°C puis immunomarquées pour l'AnxA5 (blanc). L'intervalle de temps entre l'irradiation et la fixation est estimé à 7 minutes. La majorité des myoblastes et

myotubes ont une accumulation d'AnxA5 au site de rupture.

Résultats et conclusions

De façon remarquable, nous avons observé que la grande majorité des cellules fixées 28 minutes après la rupture membranaire n'était plus présente sur le support après immunomarquage (images non montrées). Ce résultat indique que l'absence de réparation membranaire des myotubes et myotubes 578 conduit à la mort des cellules, qui se détachent du support en moins de 30 minutes. Nous avons conclu de ces expériences que l'AnxA5 préserve la capacité de se lier au site de rupture dans les cellules 578. Son recrutement est indépendant de la présence de la dysferline.

Afin de préciser la cinétique de recrutement de l'AnxA5 à la membrane endommagée, des myotubes 578 ont été irradiés en présence de 5µg/ml d'AnxA5 extracellulaire couplé au fluorophore Cy3 (AnxA5-Cy3). Immédiatement après la rupture, nous avons observé un recrutement d'AnxA5-Cy3 exactement au niveau de la zone de rupture (**Figure 4.3, +1,6s**). Ce recrutement s'est poursuivi tout au long de l'enregistrement. Le plus souvent, nous avons observé une déchirure des myotubes 578 conduisant à l'entrée de l'AnxA5-Cy3 plus profondément dans le cytoplasme (**Figure 4.3, +65,6s**). Ce résultat indique que l'AnxA5 se fixe au site de rupture en quelques secondes. Contrairement aux myotubes LHCN-M2, l'agrégat d'AnxA5 augmente continuellement en taille autour du site de rupture, au fur et à mesure que les myotubes 578 se déchirent.

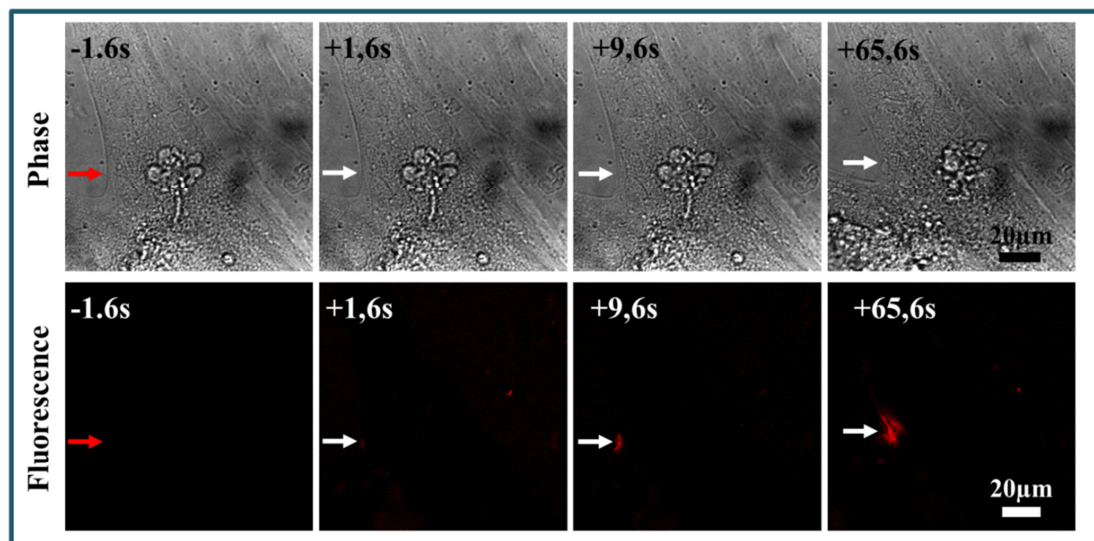


Figure 4.3 : Localisation de l'Annexine-A5-Cy3 extracellulaire après rupture de la membrane plasmique des myotubes de la lignée 578 par irradiation laser. Les myotubes ont été irradiés en présence de 5µg/ml d'AnxA5-Cy3 et de 1mM Ca^{2+} et observés simultanément en microscopie à contraste de phase (ligne du haut) et de fluorescence (ligne du bas). La zone irradiée est indiquée avec une flèche rouge avant irradiation et une flèche blanche après irradiation. Les temps indiqués correspondent au temps en secondes avant (-) et après (+) irradiation, respectivement. Dès la première seconde suivant la rupture de la membrane, l'AnxA5-Cy3 extracellulaire est mobilisée à la zone de rupture. Elle continue de s'accumuler au cours du temps, alors que le myotube se déchire

A2.b. Cas des perforations membranaires par la SLO

Nous avons ensuite étudié la distribution subcellulaire de l'AnxA5 endogène par immunocytofluorescence dans des myotubes 578 traités à la SLO pendant 2 minutes en présence de 1mM Ca^{2+} . Dans ces conditions, l'AnxA5 endogène forme des assemblages au niveau du sarcolemme (**Figure 4.4A, flèches blanches**). Nous avons systématiquement observé pour ces cellules une diminution de l'intensité de fluorescence cytoplasmique (**Figure 4.4A**) ainsi qu'un fort marquage de l'enveloppe nucléaire (**Figure 4.4A, flèches rouges**). La baisse d'intensité de fluorescence intracellulaire traduit une mobilisation forte de l'AnxA5 endogène aux sites endommagés. L'interaction de l'AnxA5 à l'enveloppe nucléaire traduit une entrée massive de Ca^{2+} dans les myotubes, consécutive à l'absence de réparation membranaire. Nous avons vérifié que ce recrutement de l'AnxA5 endogène est strictement dépendant de la présence de Ca^{2+} (**Figure 4.4B**) et de SLO (**Figure 4.4C**). En présence de SLO et en absence de Ca^{2+} , nous avons également observé une baisse de l'intensité de fluorescence cytoplasmique (**Figure 4.4B**). Cette baisse est probablement due à une fuite du contenu cytoplasmique.

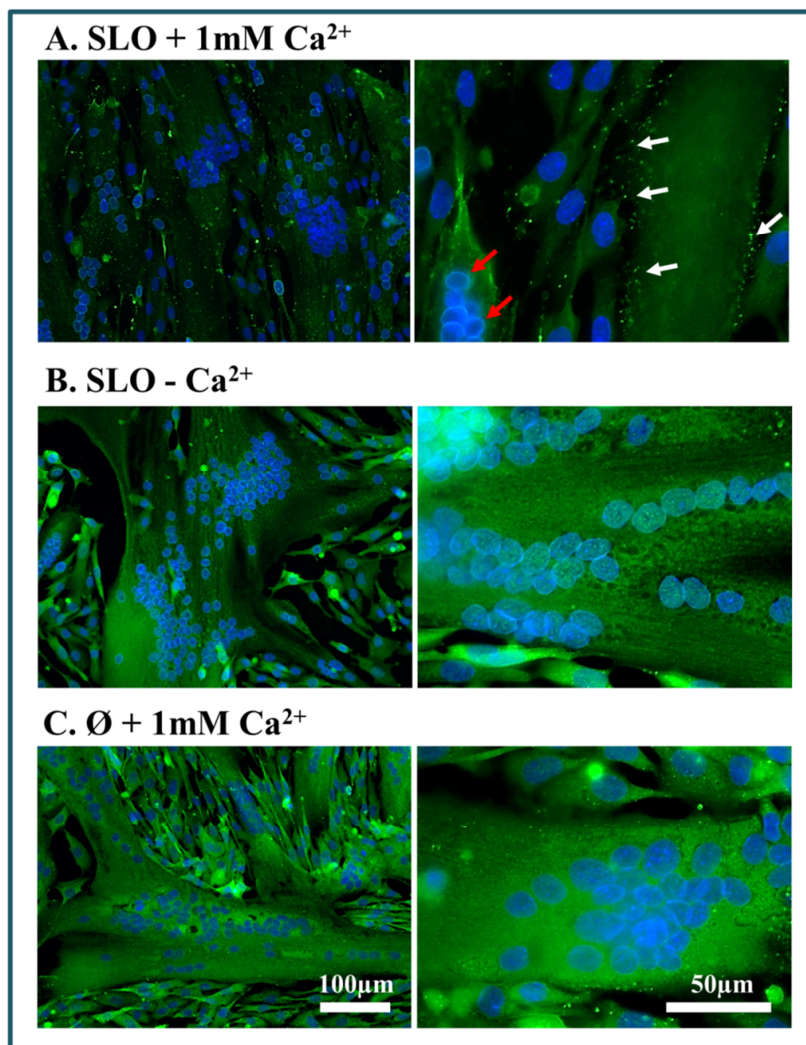


Figure 4.4 : Localisation de l'Annexine-A5 endogène après traitement des myotubes 578 avec la SLO. Les myotubes 578 ont été traités (A et B) ou non (C) avec 300ng/ml de SLO pendant 2 min à température ambiante, en présence (A et C) ou non (B) de 1mM Ca^{2+} . Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol pendant 5 min à -20°C et immunomarquées pour l'AnxA5 (vert), comme décrit dans la légende de la Figure 4.1. Un marquage au DAPI a été réalisé afin de visualiser les noyaux (bleu). Les cellules ont été observées par microscopie à épifluorescence à faible ($\times 6.3$, colonne de gauche) et à fort ($\times 37.8$, colonne de droite) grossissement. Le traitement à la SLO en présence de 1mM Ca^{2+} conduit à la formation d'assemblages d'AnxA5 (flèches blanches) à la membrane des myotubes. Il conduit également au recrutement d'AnxA5 endogène à l'enveloppe nucléaire (flèches rouges).

L'AnxA5 endogène préserve donc la capacité d'être recrutée au sarcolemme des myotubes 578 endommagés par la SLO. En revanche, ce recrutement au sarcolemme s'est systématiquement accompagné d'un recrutement à l'enveloppe nucléaire, dû à l'absence de réparation membranaire dans ces cellules.

B. Cas de la lignée 650 :

Contrairement aux cellules LHCN-M2, les myotubes et les myoblastes de la lignée 650, établie à partir d'un patient atteint de LGMD1C, expriment peu de cavéoline-3. Nous avons cherché à déterminer si l'absence de cette protéine pouvait avoir une influence sur la localisation ou le comportement de l'AnxA5 dans les cellules de cette lignée.

B1. Expression et distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les cellules 650 intactes

Nous avons analysé par western-blot le taux d'expression de l'AnxA5 dans les myoblastes et myotubes 650. Nous avons observé que l'AnxA5 endogène est exprimée à des taux comparables à ceux présents dans les myoblastes et myotubes de la lignée saine LHCN-M2 (**Figure 4.5A**). Sa masse moléculaire apparente est également inchangée, à une valeur d'environ 32kDa.

Nous avons ensuite analysé la distribution subcellulaire de l'AnxA5 endogène dans les myoblastes et myotubes 650 par immunocytofluorescence. Dans les myoblastes, l'AnxA5 est localisée dans le cytosol et le noyau (**Figure 4.5B**), alors qu'elle est présente uniquement dans le cytosol des myotubes (**Figure 4.5C**), de façon identique à ce qui a été observé pour les lignées LHCN-M2 et 578.

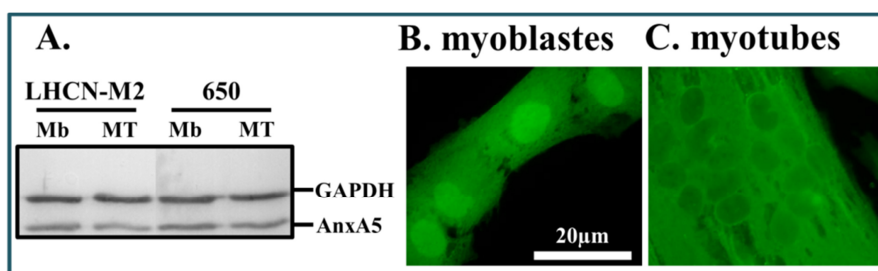


Figure 4.5 : Expression et distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les myoblastes et les myotubes 650. (A) Le contenu cellulaire en AnxA5 des myoblastes et myotubes 650 a été quantifié par western blot et comparé à la lignée LHCN-M2. 10µg d'extraits protéiques totaux de myoblastes et myotubes à J3 ont été analysés. L'AnxA5 a été détectée avec un anticorps monoclonal de souris. La protéine GAPDH a été utilisée comme témoin de dépôt. (B) et (C) Les cellules ont été fixées 5min à -20°C avec du méthanol et marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-AnxA5 1h à température ambiante. Les complexes anticorps primaires-AnxA5 ont été mis en évidence à l'aide d'un anticorps secondaire polyclonal de chèvre conjugué au fluorochrome Alexa488 (vert). Dans les myoblastes (B), l'AnxA5 est localisée dans le cytosol ainsi que dans le noyau. Dans les myotubes (C), l'AnxA5 est également cytosolique, mais peu ou pas présente dans les noyaux.

B2. Distribution subcellulaire et trafic de l'Annexine-A5 dans les cellules 650 endommagées

B2.a. Cas des ruptures mécaniques par irradiation laser

Nous avons étudié la localisation de l'AnxA5 endogène après rupture mécanique de la membrane plasmique des myoblastes et des myotubes de la lignée 650. Les cellules ont été irradiées en présence de 1mM Ca^{2+} et en absence de FM1-43 afin d'assurer un immunomarquage spécifique de l'AnxA5. Nous avons une nouvelle fois étudié la localisation de l'AnxA5 endogène pour deux intervalles de temps moyens entre l'irradiation laser et la fixation : 7 minutes et 28 minutes. Pour la majorité des myoblastes observés 7 minutes après le dommage membranaire, nous avons observé une accumulation d'AnxA5 endogène autour du site de rupture (**Figure 4.6A**). Une grande partie du marquage est cytoplasmique. Dans les myotubes 650 (**Figure 4.6B**), l'AnxA5 est recrutée au site de rupture où elle forme un assemblage de taille importante. Ce fort recrutement est probablement associé à l'absence de réparation membranaire, qui génère une entrée importante de Ca^{2+} . Comme pour les cellules 578, nous avons observé que la grande majorité des cellules de la lignée 650, fixées 28 minutes après la rupture membranaire, n'était plus présente sur le support après immunomarquage (images non montrées). Ce résultat indique que l'absence de réparation membranaire des myoblastes et myotubes 650 conduit à la mort des cellules, qui se détachent du support en moins de 30 minutes. Nous avons conclu de ces expériences que, comme pour les cellules 578, l'AnxA5 préserve la capacité de se lier au site de rupture dans les cellules 650. Son recrutement est donc indépendant de la présence de la cavéoline-3.

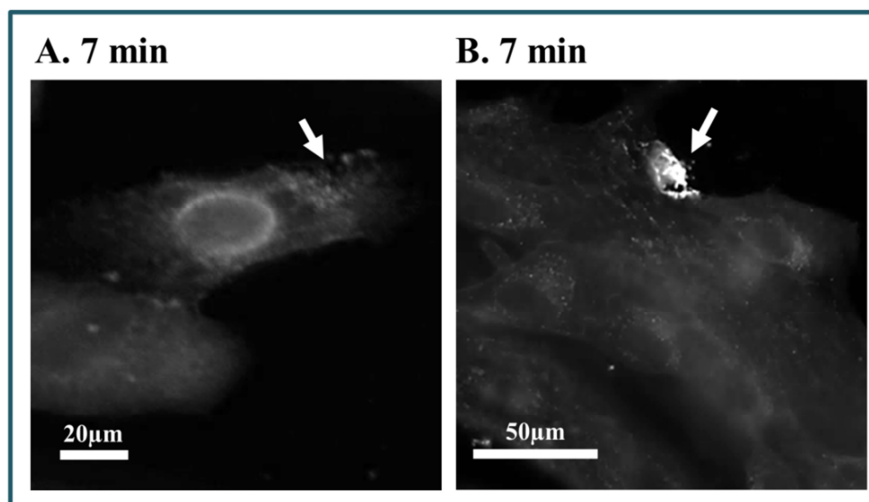


Figure 4.6 : Distribution subcellulaire de l'Annexine-A5 endogène dans les myoblastes et myotubes 650 endommagés par irradiation laser. Les myoblastes (A) et myotubes (B) ont été irradiés avec un laser d'une puissance de 110mW ($\pm 5\text{mW}$) en présence de 1mM Ca^{2+} . Après irradiation, les cellules ont été fixées au méthanol pendant 5 min à -20°C puis immunomarquées pour l'AnxA5 (blanc). L'intervalle de temps entre l'irradiation et la fixation est estimé à 7 minutes. La majorité des myotubes présente une accumulation d'AnxA5 au site de rupture.

Afin de préciser la cinétique de recrutement de l'AnxA5 à la membrane endommagée, des myotubes 650 exprimant la protéine de fusion EGFP-AnxA5 ont été irradiés. Immédiatement après la rupture, nous avons observé un recrutement de l'EGFP-AnxA5 au site de rupture de la membrane plasmique (**Figure 4.7, +6.4s, flèche**). Contrairement au comportement observé dans les myotubes LHCN-M2, l'agrégat d'AnxA5 augmente continuellement en taille et en intensité, même plusieurs minutes après le dommage membranaire (**Figure 4.7, +160s, flèche**). Nous avons observé au cours du temps une baisse de l'intensité de fluorescence intracellulaire traduisant une mobilisation importante de l'AnxA5 au site de rupture et/ou à une fuite du contenu cytoplasmique.

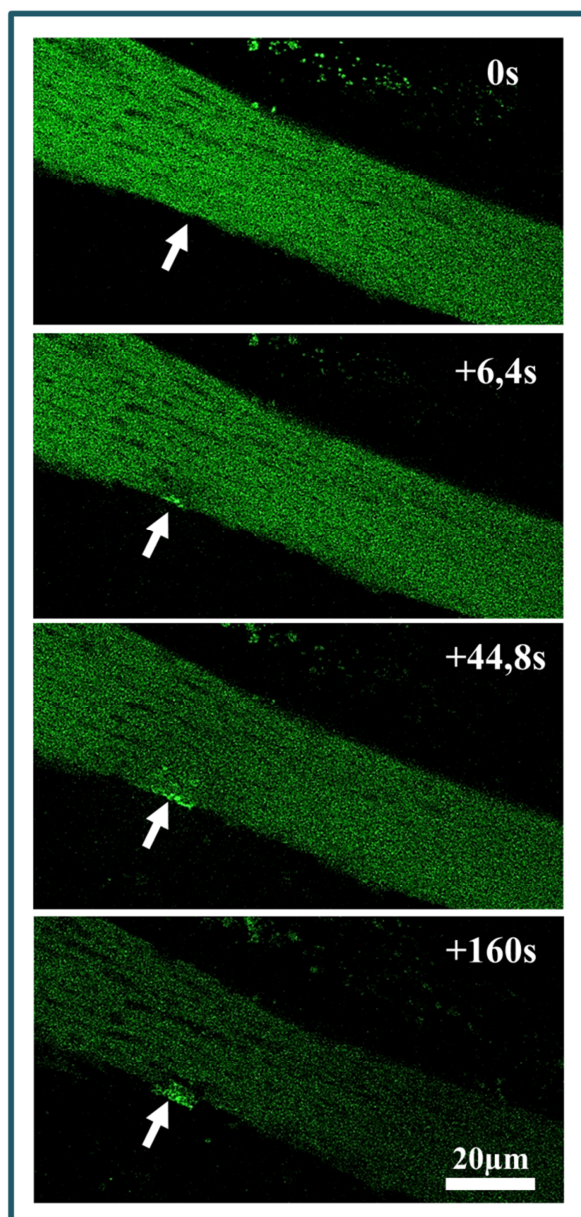


Figure 4.7 : Localisation subcellulaire de l'EGFP-Annxine-A5 au cours du temps dans les myotubes 650 après irradiation laser. Les myotubes 650 transfectés par le plasmide pDEST14-EGFP-AnxA5 ont été irradiés avec un laser d'une puissance de 110 (\pm 5) mW en présence de 1mM Ca^{2+} . L'EGFP-AnxA5 (vert) a été imagée avant (0s) et après (+) l'irradiation laser. Les flèches blanches indiquent la zone membranaire irradiée. Les temps correspondent aux délais après irradiation laser. Dans les myotubes, l'EGFP-AnxA5 est recrutée au niveau du site de rupture en quelques secondes. L'agrégat d'AnxA5 augmente continuellement au cours de l'enregistrement.

L'AnxA5 endogène préserve donc la capacité de se lier au site de rupture dans les myotubes 650, malgré l'absence de la cavéoline-3 et l'absence de réparation membranaire. Comme pour les cellules 578, l'absence de réparation membranaire est la cause d'une entrée importante de Ca^{2+} qui conduit à une accumulation continue de l'AnxA5 au niveau du site membranaire endommagé.

B2.b. Cas des perforations membranaires par la SLO

Alors que les myotubes 650 sont incapables de réparer des ruptures mécaniques du sarcolemme, nous avons montré qu'ils peuvent restaurer l'intégrité de leur membrane plasmique suite aux dommages générés par l'insertion de la SLO (**cf Figure 2.17**). Afin de déterminer, le comportement de l'AnxA5 endogène dans ces conditions, nous avons étudié sa distribution subcellulaire par immunocytofluorescence dans des myotubes 650 traités à la SLO pendant 2 minutes en présence de 1mM Ca^{2+} . En présence de Ca^{2+} , le traitement des myotubes avec la SLO entraîne la formation d'agrégats d'Anx-A5 ainsi qu'une baisse de l'intensité de fluorescence intracellulaire (**Figure 4.8A, flèche**). Cette baisse provient sans doute de la forte mobilisation de l'AnxA5 aux membranes exposant des PS. L'accumulation d'AnxA5 endogène n'est pas observée ni en absence de Ca^{2+} (**Figure 4.8B**), ni en absence de SLO (**Figure 4.8C**). Nous avons observé que l'enveloppe nucléaire est plus rarement et plus faiblement marquée, comparé à ce que nous avons observé pour les myotubes 578. Ce résultat est probablement dû à la présence de mécanisme de réparation de la membrane endommagée par la SLO, qui limite la propagation du Ca^{2+} dans la cellule.

C. Conclusion :

Dans les contextes pathologiques de LGMD2B ou de LGMD1C, la localisation subcellulaire et le recrutement de l'AnxA5 après rupture de la membrane plasmique ne semblent pas être affectés. Son taux d'expression dans les cellules 578 et 650 est très similaire à celui observé dans les cellules saines LHCN-M2. D'autre part, elle a une distribution subcellulaire comparable aux cellules saines. Lors d'un dommage membranaire mécanique, elle conserve la capacité de se lier à la zone de rupture en quelques secondes. En revanche, contrairement aux cellules saines où nous avons observé une disparition progressive de l'assemblage d'AnxA5, nous avons observé, pour les cellules 578 et 650, une accumulation continue de l'AnxA5. Cette accumulation est probablement due à l'absence de réparation membranaire dans ces cellules, qui conduit à une entrée ininterrompue de Ca^{2+} . Nous avons observé que ces cellules finissent par mourir et se décrocher du support dans les 30 minutes suivant la rupture membranaire.

Les dommages créés par l'insertion de la SLO dans le sarcolemme des cellules 578 et 650, conduisent à la formation de multiples agrégats d'AnxA5 endogène, majoritairement à la membrane plasmique. Ce résultat est tout à fait similaire à celui observé dans les cellules LHCN-M2. Pour les myotubes 578, qui sont incapables de restaurer l'intégrité de leur sarcolemme lors d'un traitement à la SLO, nous avons observé une forte baisse de l'intensité

Résultats et conclusions

de fluorescence cytoplasmique. Cette baisse est probablement due à l'entrée importante de Ca^{2+} dans les cellules qui conduit à la séquestration de l'AnxA5 aux membranes. Nous avons d'ailleurs observé fréquemment un marquage de l'enveloppe nucléaire.

La fonction principale de l'AnxA5 dans la réparation membranaire, consistant à se lier au site de rupture afin de stabiliser la membrane endommagée, ne semble donc pas être altérée dans ces contextes pathologiques. Le recrutement de l'AnxA5 au site de rupture est donc totalement indépendant de la dysferline et de la cavéoline-3.

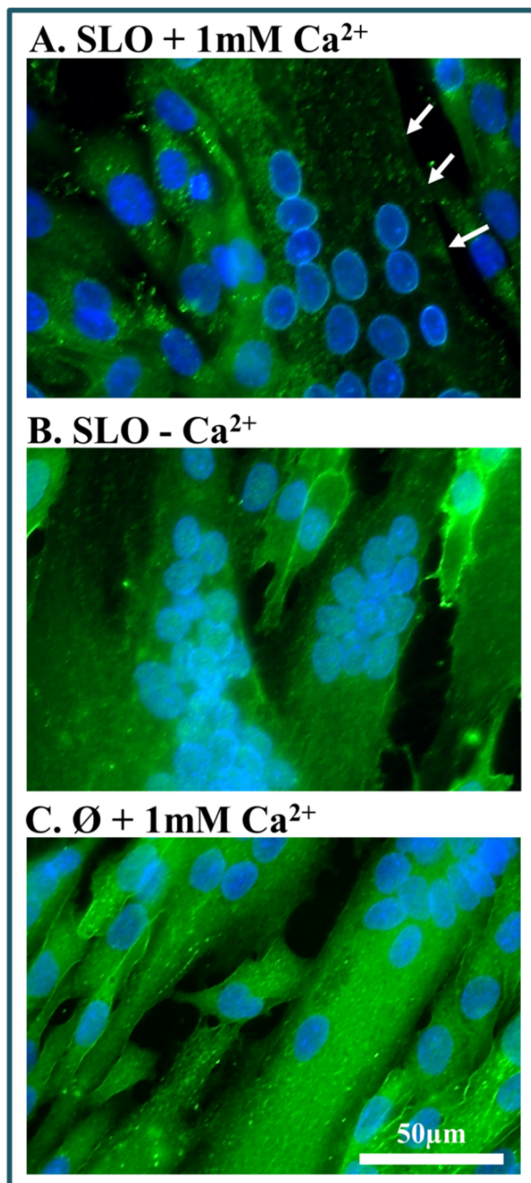


Figure 4.8 : Localisation de l'AnxA5 endogène après traitement des myotubes 650 avec la SLO. Les myotubes 650 ont été traités (A et B) ou non (C) avec 300ng/ml de SLO pendant 2 min à température ambiante, en présence (A et C) ou non (B) de 1mM Ca^{2+} . Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol pendant 5 min à -20°C et immunomarquées pour l'AnxA5 (vert), comme décrit dans la légende de la Figure 4.5. Un marquage au DAPI a été réalisé afin de visualiser les noyaux (bleu). Le traitement à la SLO en présence de 1mM Ca^{2+} conduit à la formation d'agrégats d'AnxA5 (flèches blanches) à la membrane des myotubes.

Partie B : Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire des cellules trophoblastiques humaines

Le trophoblaste est la première barrière séparant le sang maternel du sang fœtal. Il forme une couche à deux feuillets cellulaires recouvrant la totalité des villosités placentaires. Le feuillet le plus externe de cette structure est le syncytiotrophoblaste. Il est composé de cellules plurinucléées, appelées syncytiotrophoblastes (ST). Ce sont des cellules post-mitotiques dont la pérennité est assurée par le recrutement et la fusion des cellules mononucléées du feuillet sous-jacent, appelées cytotrophoblastes (CT). Les ST ont un rôle essentiel dans le fonctionnement du placenta pour la croissance et le développement embryonnaire, via la production d'hormones placentaires (Gude et al. 2004). Directement en contact avec le sang maternel, les ST assurent aussi le rôle de filtre pour les échanges gazeux, ioniques et de nutriments, par l'intermédiaire de microvillosités présentes à leur surface apicale (Burton et Jones 2009).

Les ST bordent l'ensemble de l'espace intervilloux dans lequel le sang maternel se déverse par saccades, depuis les artérioles spiralées du système vasculaire maternel. L'espace intervilloux (ou chambre intervillieuse) représente 40% du volume placentaire total, soit 250 ml (Stave 2013) à terme. Il a été estimé qu'il se remplit 2 à 3 fois par minute. Un flux sanguin constant est donc généré dans la chambre intervillieuse par l'arrivée de sang maternel, à une pression de 70 à 80mm de mercure (Y. Wang et Zhao 2010). Ce flux sanguin heurte la plaque chorale, formée par les ST, puis diffuse et ressort par les veines utéroplacentaires. Les ST sont par conséquent soumis en permanence à des contraintes de cisaillement.

Le nombre de CT fusionnant avec les ST excède le nombre requis pour leur régénération et leur croissance cellulaire (Huppertz et al. 1998). Les ST éliminent l'excès de matériel membranaire par émission dans le sang maternel de particules de plusieurs dizaines de μm , nommées « knots », « sprouts » ou exosomes syncytiaux (Burton et Jones 2009). La quantité de matériel membranaire émis par les ST dans le sang maternel est considérable. Lors d'une étude sur des explants de placenta âgés de 3 mois, le nombre de particules émises par jour a été évalué à $4,7 \times 10^4$ (Abumaree, Stone, et Chamley 2006). Par extrapolation, les auteurs de cette étude ont estimé que les ST émettent $8,5 \times 10^5$ particules par jour, pour un placenta à terme. Les mécanismes moléculaires régulant ces émissions de particules restent peu connus. L'émission intensive de ces particules fragilise la membrane apicale des ST. Cette fragilité membranaire, associée aux contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguin maternel, sont des facteurs favorisant la formation de rupture mécanique de la membrane apicale des ST.

Vandré et collaborateurs ont récemment révélé la présence de la dysferline dans les ST (Vandré et al. 2007). La dysferline est une protéine majeure de la machinerie de réparation membranaire, particulièrement dans les fibres musculaires (Bansal et al. 2003). La présence de la dysferline majoritairement au pôle apical des ST a conduit Vandré et ses collaborateurs à postuler sur l'existence d'une machinerie dédiée à la réparation membranaire. Cette hypothèse restait à démontrer.

Nous avons initié cette étude en 2012, dans le cadre d'un projet intitulé PlacentaA5, financé par l'ANR (ProjetANR-2011-BLAN-BSV1-03501, 2012-2015). En collaboration avec l'équipe dirigée par Danièle Evain-Brion (INSERM U1139, Université Paris Descartes, Paris), ce projet avait pour objectif d'étudier le rôle de l'AnxA5 dans la réparation et la régénération du placenta humain. **Le premier objectif de notre étude a consisté à analyser la capacité de réparation membranaire des CT et ST.**

Dans les ST, Vandré et collaborateurs ont observé que la dysferline n'est pas associée aux cavéolines (Vandré et al. 2007). Dans le muscle strié squelettique, la dysferline et la cavéoline-3 agissent de concert pour assurer une réparation membranaire efficace (C. Matsuda et al. 2001) (Cai, Weisleder, Ko, Komazaki, et al. 2009b). L'absence d'association entre la dysferline et les cavéolines a donc suggéré l'existence de mécanismes de réparation différents dans les ST. **Le second objectif de notre étude a consisté à chercher à préciser le(s) mécanisme(s) mis en jeu pour assurer la réparation membranaire dans les CT et ST.**

Le placenta est l'un des organes les plus riches en AnxA5. Elle a d'ailleurs été identifiée pour la première fois dans le placenta, et initialement nommée PAP-1, pour « placental anti-coagulant protein-1 » (Funakoshi et al. 1987). L'équipe ayant démontré la fonction essentielle de l'AnxA5 dans la réparation membranaire des cellules périvasculaires murines (Bouter et al. 2011), **le troisième objectif de ce travail a consisté à analyser le rôle joué par l'Anx-A5 dans les trophoblastes humains.**

Les résultats de ces travaux ont été publiés début 2015 dans le journal *Biochimica et Biophysica Acta*, dans un article intitulé « Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts ». Cet article décrit la réponse des CT et ST suite à une rupture mécanique de leur membrane plasmique. Il décrit également le rôle joué par l'AnxA5 dans les processs de réparation membranaire de ces cellules. Enfin, il propose des mécanismes assurant les étapes de colmatage de la rupture membranaire puis de restauration de la membrane plasmique. Il soulève également la question de la relation pouvant exister entre un défaut de réparation membranaire et la pré-éclampsie, une pathologie placentaire sévère pouvant conduire à la mort du fœtus.

Fort des connaissances acquises sur le rôle joué par l'AnxA5 dans la réparation membranaire des cellules périvasculaires murines et des trophoblastes humains, nous avons publié une mini-revue intitulée « Annexin-A5 and cell membrane repair », dans le journal *Placenta*. Cette mini-revue présente de façon synthétique l'ensemble des connaissances sur les mécanismes de réparation membranaire et sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'AnxA5. Il propose également un modèle décrivant comment, de façon universelle, l'AnxA5 intervient pour assurer la réparation de la membrane plasmique. Les deux articles sont présentés ci-après.



Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts☆



Romain Carmeille^a, Séverine A. Degrelle^{b,c,d}, Laurent Plawinski^a, Flora Bouvet^a, Céline Gounou^a, Danièle Evain-Brion^{b,c,d}, Alain R. Brisson^a, Anthony Bouter^{a,*}

^a Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nano-objects, UMR 5248, CNRS, University of Bordeaux, IPB, F-33600 Pessac, France

^b Fondation PremUP, Paris, F-75006, France

^c INSERM, U1139, Paris, F-75006, France

^d Université Paris Descartes, UMR-S1139 Sorbonne Paris Cité, Paris, F-75006, France.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2014

Received in revised form 25 November 2014

Accepted 27 December 2014

Available online 14 January 2015

Keywords:

Membrane repair

Annexin-A5

Placenta

Trophoblast

Membrane resealing

Lesion removal

ABSTRACT

Annexin-A5 (AnxA5) is the smallest member of the annexins, a group of soluble proteins that bind to membranes containing negatively-charged phospholipids, principally phosphatidylserine, in a Ca^{2+} -dependent manner. AnxA5 presents unique properties of binding and self-assembling on membrane surfaces, forming highly ordered two-dimensional (2D) arrays. We showed previously that AnxA5 plays a central role in the machinery of cell membrane repair of murine perivascular cells, promoting the resealing of membrane damages via the formation of 2D protein arrays at membrane disrupted sites and preventing the extension of membrane ruptures. As the placenta is one of the richest source of AnxA5 in humans, we investigated whether AnxA5 was involved in membrane repair in this organ. We addressed this question at the level of human trophoblasts, either mononucleated cytotrophoblasts or multinucleated syncytiotrophoblasts, in choriocarcinoma cells and primary trophoblasts. Using established procedure of laser irradiation and fluorescence microscopy, we observed that both human cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts repair efficiently a μm^2 -size disruption. Compared to wild-type cells, AnxA5-deficient trophoblasts exhibit severe defect of membrane repair. Through specifically binding to the disrupted site as early as a few seconds after membrane wounding, AnxA5 promotes membrane resealing of injured human trophoblasts. In addition, we observed that a large membrane area containing the disrupted site was released in the extracellular milieu. We propose mechanisms ensuring membrane resealing and subsequent lesion removal in human trophoblasts. This article is part of a Special Issue entitled: 13th European Symposium on Calcium.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Plasma membrane disruption is a general phenomenon induced by mechanical stress in physiological conditions, which leads to the entry into cells of extracellular Ca^{2+} at mM concentration. Increase of intracellular Ca^{2+} concentration activates the repair protein machinery in eukaryotic cells ensuring a rapid resealing of large plasma membrane ruptures and preventing cell death [1–3]. Several models of membrane repair have been proposed, their occurrence probably depending on the size and the type of rupture [2,4]. The classical model of membrane repair is based on the formation of a lipid patch built by the fusion of intracellular vesicles, followed by the recruitment of this patch at the wounded site, which reseals the plasma membrane [5–8]. Recently it

has been proposed that membrane repair relies primarily on exocytosis of lysosomal sphingomyelinase, which hydrolyses phosphorylcholine head group of sphingomyelin and induces the formation of ceramide-driven membrane invaginations, thus triggering lesion removal by an endocytic pathway [4,9]. Other groups have proposed that cell membrane repair occurs by removing membrane lesion through bleb formation [10] or shedding [11] using notably the ESCRT complex [12].

According to the classical model of membrane repair, mM- Ca^{2+} sensitive proteins, like dysferlin [13–15], MG-53 [16], AHNK [17], calpains [18,19] and annexins [20–23], allow cytoplasmic vesicles to fuse and form a lipid patch, which is recruited to the damaged site of the plasma membrane. The membrane repair machinery starts to be identified, yet remains largely unknown. As defect in membrane repair is responsible for the development of muscular dystrophies such as limb-girdle muscular dystrophy type-2B and Miyoshi myopathy [13,14] and limb-girdle muscular dystrophy type-1C [24], major attention on membrane repair focused on skeletal muscle cells. Little is yet known on membrane repair in other tissues.

The human placental trophoblast is the primary barrier separating maternal blood from fetal blood. This epithelium-like tissue covering

Abbreviations: AnxA5, Annexin-A5; CT, cytotrophoblasts; D-PBS, Dulbecco's phosphate buffer saline; PS, phosphatidylserine; ST, syncytiotrophoblasts

☆ This article is part of a Special Issue entitled: 13th European Symposium on Calcium.

* Corresponding author at: Bât. B14, Allée Geoffroy Saint Hilaire, 33600 Pessac, France. Tel.: +33 540006860; fax: +33 540002200.

E-mail address: a.bouter@cbmn.u-bordeaux.fr (A. Bouter).

the placenta is a two-layered structure, the outer layer forming syncytia [25], named syncytiotrophoblasts (ST), which expands by fusion of underlying progenitor mononucleated cytotrophoblasts (CT) throughout pregnancy (Scheme 1). ST are the site of numerous placental functions including gas, ion and nutrient exchange and hormone synthesis required for fetal growth and development [26,27]. The trophoblastic layers protrude as finger-shaped villi in the intervillous space where the maternal blood circulates from the beginning of the second trimester. The apical membrane of ST is formed of very abundant but fragile microvilli bathing in maternal circulation. Surface expansion of the ST increases from 0.3-m² at 12 weeks of pregnancy to about 13-m² at term [25]. The number of CT fusing with preformed ST along pregnancy exceeds the required number for cell maintenance and growth [28]. The excess of material is shed from the syncytial surface into the maternal blood as ST-derived particles, named knots, sprouts or syncytial exosomes [29,30]. A very large amount of syncytial particles is shed per day, estimated at 4.7×10^4 and 8.5×10^5 particles for a 12-weeks and a 9-months placenta, respectively [25,31]. The molecular mechanisms leading to ST-derived particles shedding and the required processes of membrane repair at the site where a syncytial knot/sprout breaks away, are poorly understood. The revelation of the unexpected presence in ST of dysferlin, a major component of the muscle cell membrane repair machinery, hitherto supposed being specific to skeletal muscle, highlighted the existence of a machinery enabling an efficient plasma membrane repair in trophoblasts [32].

Disturbances of ST formation or functions are observed in pathological conditions. Preeclampsia, eclampsia and other pregnancy diseases are associated with exacerbated trophoblast deportation into maternal blood [33–37]. The deportation of trophoblast knots induces inflammatory response of maternal endothelial cells, directly involved in the physiopathology of preeclampsia [29]. As placental dysferlin expression drops by 38% in severe preeclampsia [38], a defect in membrane repair in preeclamptic ST may be hypothesized.

The annexins (Anx), a protein family presenting 12 members in humans, share the property of binding to negatively-charged lipid membranes, primarily those containing phosphatidylserine (PS) in a Ca²⁺-dependent manner [39]. Several of their properties argue for their contribution in membrane repair processes such as their participation in numerous endo- and exo-cytic events by interaction with

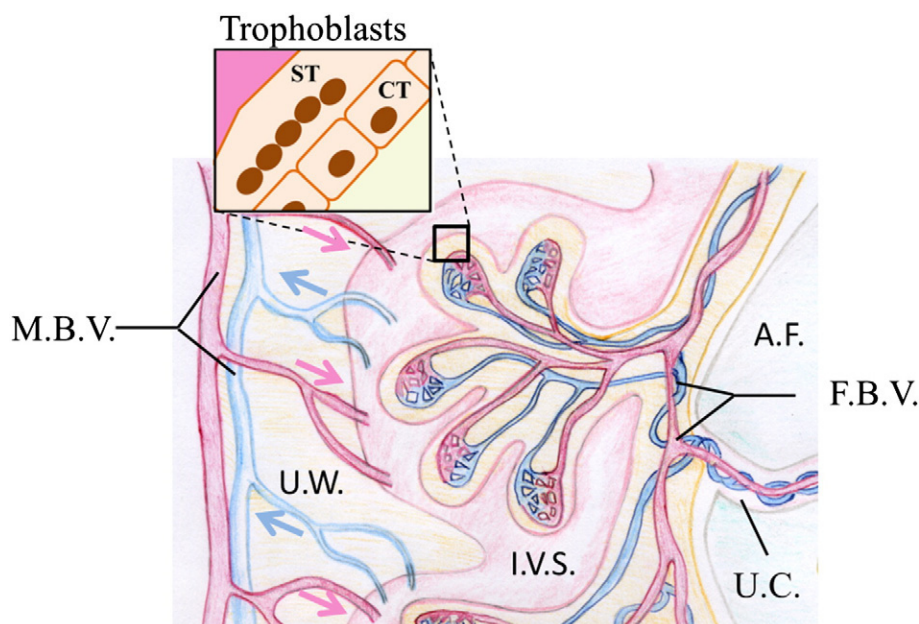
filamentous actin [40,41] and their ability to aggregate membranes [42,43]. During the last decade, many annexins have been shown to participate in membrane repair processes. AnxA1 and AnxA2 trigger intracellular vesicles fusion during the lipid patch formation and promote its attachment to the plasma membrane, by interacting with dysferlin at sarcolemma in normal muscle [20,21]. The absence of interactions between AnxA1–A2 and dysferlin is associated to a defect in membrane repair in dysferlinopathic mouse [20]. Recently, it has been shown that membrane repair of zebrafish skeletal muscle may be based on building of a highly ordered scaffold involving dysferlin, AnxA6, AnxA2 and AnxA1, in a chronological order [23]. Our group demonstrated that AnxA5 plays a critical role in membrane repair of murine perivascular cells by forming a two-dimensional (2D) array at the level of the torn membrane edges. This 2D array prevents wound expansion, which is due to the tension exerted by cytoskeleton, and promotes membrane resealing [22].

As the placenta is one of the richest source of AnxA5 in humans, we investigated whether AnxA5 was involved in membrane repair in this organ. First we assessed the ability of human trophoblasts to repair their plasma membrane and subsequently examined the role of endogenous and extracellular AnxA5 in this process. We addressed this question at the level of the human trophoblastic BeWo cell line and of human primary trophoblasts, either mononucleated CT or multinucleated ST. Using established procedures of laser irradiation and fluorescence microscopy, we compared the response of wild-type trophoblastic cells, which express constitutively AnxA5, and cells rendered deficient in AnxA5 by RNA interference. We found that endogenous AnxA5 promotes membrane resealing in both CT and ST, by interacting with plasma membrane at the injured site. The results achieved through this study led us to propose mechanisms for membrane resealing and lesion removal after membrane injury in human trophoblasts.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Cell culture media and reagents were from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) except when otherwise stated.



Scheme 1. Simplified scheme displaying trophoblasts localization in the placenta. A.F.: amniotic fluid; F.B.V.: fetal blood vessels; I.V.S.: intervillous space; M.B.V.: maternal blood vessels; U.C.: umbilical cord; U.W.: uterine wall.

All cell cultures were kept under standard conditions (37 °C, humidified atmosphere, 5% CO₂).

2.1.1. Placental tissue collection and culture of primary trophoblasts

Term placentas were obtained after Caesarean section from healthy mothers with uncomplicated pregnancies delivered at 37–41 weeks of gestation. These biological samples were obtained following informed patient written consent and approval from local ethics committee (CCPPRB, Paris Cochin, N°18-05, Paris, France). Term villous CT were isolated from chorionic villi by differential sequential trypsin digestion and further purified on percoll gradient as previously described [44]. Cells were maintained in culture over 72 h in complete DMEM to form ST.

2.1.2. Culture of BeWo cells

The choriocarcinoma BeWo cell line was cultured in Ham's F12K medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 5-mM L-glutamine, 100-units/mL penicillin and 100-μg/mL streptomycin and passaged twice a week to keep them in logarithmic growth. Differentiation and fusion of BeWo cells were induced by incubating the cells with 100-μM 8-Br-cAMP (Sigma) for 48-h in growth condition.

2.2. Western blotting

2.10⁶ cells were trypsinized, pelleted and re-suspended in 300 μL of Dulbecco's phosphate buffer saline (D-PBS) depleted in Ca²⁺ and supplemented with 1-mM EGTA. Protein extracts were obtained by sonicating the ice-cold cell solution with a Branson digital sonifier (amplitude 20%, duration 2-min, interval 5-s and pulse 5-s). Two successive centrifugations at 13,000-g for 1-min allowed to remove cell debris. 10-μg protein extracts were separated on a 10% SDS-PAGE. Semi-dry electrophoretic transfer (Bio-Rad) onto PVDF membrane was performed for 1-h at 100-V. The cellular content of AnxA5 and GAPDH (loading control) was detected with a mouse anti-AnxA5 monoclonal antibody (Sigma) and a rabbit anti-GAPDH polyclonal antibody (Santa Cruz), respectively. Both antibodies were diluted 1:1000 in saturation solution composed by Tris buffer saline (10-mM Tris, 150-mM NaCl, pH 8.0) supplemented with 0.1% Tween20 and 5% non-fat dry milk. Revelation was performed using secondary antibodies coupled to horse-radish peroxidase (Amersham) diluted 1:2000 in saturation solution and Opti-4CN™ colorimetric kit (Bio-Rad).

2.3. Membrane rupture and repair assay

BeWo cells and primary trophoblasts were cultured in complete growth medium without red phenol on 8-well Ibidi-treat μslide™ (Biovalley). Cells were incubated 5-min before acquisition with 5-μg/mL FM1 — 43FX (referred to hereafter as FM1 — 43 (Invitrogen)) in D-PBS and maintained over ice. To induce membrane damage, cells were irradiated at room temperature (20–21 °C), at 820-nm with a Chameleon-Vision™ mode-locked Titanium:Sapphire laser (Coherent Inc, CA, USA) of a two-photon confocal scanning microscope (TCS SP2 AOBS, Leica) equipped with an HCX PL APO CS 63.0 × 1.40 oil-objective lens. Irradiation consisted of 3 successive scans (1.6 s per scan) of a 1-μm × 1-μm area with a power of 110-mW. 512 × 512 images were acquired at 1.6-s intervals with pinhole set to 1 Airy unit. For each condition, at least 100 cells from three independent experiments were analyzed. Two independent experiments are — conducted on different days, — performed on cells with different passage numbers and performed with freshly prepared FM1 — 43 and D-PBS solutions.

Membrane rupture and repair processes were monitored by measuring the variations in fluorescence intensity of FM1 — 43. FM1 — 43 was excited by the 488-nm laser line (intensity set at 40% of maximal power) and fluorescence emission was measured between 520-nm and 650-nm. For quantitative analysis, the fluorescence intensity was integrated over the whole cell surface and corrected for the fluorescence

value recorded before irradiation, using ImageJ program. In order to characterize the magnitude and the rate of FM1 — 43 uptake, the fluorescence intensity changes were fitted according to the following “mono-exponential rise to maximum” equation [45]: Fluorescence Intensity = (1 — exp(—B * t)) * A, where A corresponds to the maximal intracellular fluorescence intensity and B is equal to Ln2/τ_{1/2}. This model implying the existence of a plateau, only repairing cells were therefore analyzed. Curve fitting was performed using Sigmaplot software (Systat Software inc., San Jose, USA).

2.4. Localization of endogenous AnxA5 in intact and damaged BeWo cells

For analysis in damaged BeWo cells, 2.10⁵ cells were cultured in a 35-mm glass bottom dish equipped with a square-patterned coverslip (MatTek, Ashland, USA). Cell membrane rupture was performed according to the protocol described above, but in the absence of FM1 — 43 to avoid fluorescence cross-talk. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature after laser irradiation was completed. Fixation was terminated by adding 50-mM NH₄Cl. All subsequent steps (permeabilization, incubation with antibody and washes) were performed using 0.1% Triton X-100 and 1% BSA in D-PBS solution. Mouse anti-AnxA5 monoclonal antibody (Sigma) and secondary Alexa488-coupled anti-mouse goat antibody (Invitrogen) were successively incubated with cells for 1-h at 37 °C. Finally, cells were washed in D-PBS and a nuclear counterstaining was performed with DAPI (Sigma). For each condition, about 10 cells from three independent experiments were analyzed.

For analysis of intact cells, 2.10⁴ cells/cm² were cultured in 8-well Ibidi-treat μslide™. Cells were immunostained employing the same protocol as described above for damaged cells from the step of paraformaldehyde fixation.

2.5. Localization of extracellular AnxA5 in damaged BeWo cells

Cells were incubated over ice in the presence of 3-μg.mL⁻¹ Cy5-AnxA5 in D-PBS containing 1 mM Ca²⁺ for 5-min before irradiation. Cell membrane rupture was performed according to the protocol described above, but in the absence of FM1 — 43 to avoid fluorescence cross-talk. Cy5-AnxA5 was excited by the 633-nm laser line (intensity set at 60% maximal power) and its emission recorded between 650- and 750-nm.

2.6. Immunodetection of AnxA5 at the surface of undamaged trophoblastic cells

2.10⁴/cm² primary trophoblasts or BeWo cells were cultured in 8-well Ibidi-treat μslide™. Live cells were incubated in the presence of anti-AnxA5 antibody coupled to Alexa488 for 45 min à 4 °C in D-PBS supplemented with 1-mM Ca²⁺. After D-PBS washes, cells were fixed by 4% paraformaldehyde. As control, some cells were immunostained in the same conditions but after 4%-paraformaldehyde fixation and Triton X-100 permeabilization.

2.7. AnxA5-targeting siRNA transfection in BeWo CT

Reverse and forward siRNA transfection protocols were successively applied on 2.10⁴ BeWo cells/cm². AnxA5-targeting siRNAs were from Invitrogen and consisted in a mix of two sequences: siRNA_A5_1 5' GGGCUGAUGCAGAAACUCUUCGAA3' and siRNA_A5_2 5' GAGGAAAC CAUUGACCGCGAGACUU3'. Transfection protocol (for 2.10⁴ cells) consisted in incubating 2-pmol of AnxA5-targeting siRNAs and 0.6-μL RNAimax™ lipofectant solution (Invitrogen) in 50 μL Optimem, for 30-min at room temperature. The mixture was added drop-by-drop on trypsinized cell suspension (Reverse method) or adherent cells (Forward method) maintained in growth medium depleted in antibiotics. After 4-h incubation at 37 °C, transfection medium was replaced

by growth medium. Cells were analyzed 48 h after the forward transfection.

2.8. AnxA5-targetting shRNA lentiviral particle transduction in BeWo ST

The following shRNA sequences, cloned into the pLKO.1 puro-vector (MISSION® shRNA plasmids, Sigma), were used:

AnxA5-targetting shRNA: 5'-CCGGCGGAGACTTCTGGCAATTACTC GAGTAAATTGCCAGAAGTCTCGCGTTTT-3'; Control non-target shRNA: 5'-CCTAAGGTAAAGTCGCCCTCGTCGAGCGAGGGCGACTTA ACCTTAGG-3'.

Lentiviral-based particles containing shRNAs were produced by Bordeaux University Lentiviral Vectorology Platform (US005, Bordeaux, France) by transient transfection of 293 T cells. BeWo cells were plated at 2.10^4 cells per well in 8-well Ibidi-treat μ slide™ and incubated for 24-h in complete medium. Transduction was carried out by adding concentrated lentiviral particles to the cells at multiplicity of infection of 30 in complete medium depleted in antibiotics for 24-h. The medium was then replaced with fresh complete medium supplemented with 100- μ M 8-Br-cAMP for 24-h. Cells were subsequently incubated with complete medium containing 1- μ g/ml puromycin (Sigma) in order to select transduced cells. 24-h after antibiotic treatment, membrane repair assays were performed as described above.

3. Results

3.1. Membrane repair assay in human trophoblasts

In order to examine membrane repair ability of human trophoblasts at the level of CT and ST, BeWo cells were cultured either in the absence or in the presence of 100- μ M 8-Br-cAMP for 48 h, respectively. Whereas BeWo cells remain as mononucleated cells (hereafter referred as BeWo CT) in free-cAMP growth condition, they differentiate and fuse in the presence of cAMP, forming large multinucleated cells (hereafter referred as BeWo ST). Typical images of BeWo CT and BeWo ST are presented in Figure S1.

We applied a well-established protocol of cell membrane disruption based on near infra-red laser irradiation [14,22]. By focusing the laser on plasma membrane for a few seconds, a μ m²-size membrane rupture was created in a controlled and highly reproducible way. To assess membrane disruption and repair, cells are irradiated in the presence of FM1–43, a water-soluble dye which becomes fluorescent upon inserting into lipid membranes, yet is unable to cross membranes. Therefore, cells with damaged plasma membrane exhibit an increase of fluorescence intensity due to the passive entrance of FM1–43 molecules into the cytosol and their incorporation into intracellular membranes. The process of membrane repair is monitored by time-lapse imaging of cytoplasmic FM1–43 fluorescence intensity after irradiation. Membrane resealing leads to a stop in the entry of FM1–43 molecules into the cytosol and therefore to a stop in the increase of the intracellular fluorescence intensity.

Membrane repair assay was first performed on BeWo CT in the presence of 1-mM Ca^{2+} (Fig. 1A). Irradiation conditions were adjusted (110-mW) to cause mild membrane injury to cells, as indicated by the absence of a large disruption at the irradiated site (Fig. 1A-frame 2, arrow). The cytoplasmic fluorescence intensity increased locally as early as a few seconds after irradiation (Fig. 1A-frames 2–3), indicating the presence of a membrane rupture. 120-s after plasma membrane disruption (Fig. 1A-frame 4), we observed that entry of FM1–43 remained limited to an area close to the disruption site. Analysis of the kinetics of intracellular fluorescence intensity variations showed that fluorescence increased for about 80-s and then reached a plateau (Fig. 1D, blue filled circles). The plateau indicated that entrance of FM1–43 molecules stopped and therefore that plasma membrane had resealed. Ca^{2+} is

known to be a crucial component of membrane repair processes by activating most, if not all, of the steps of membrane resealing. As a control experiment, BeWo CT were irradiated in the absence of Ca^{2+} (Fig. 1B). In this condition, damaged BeWo CT exhibited a large entry of FM1–43 within the cell, characterized by a continuous and large increase of intracellular fluorescence intensity (Fig. 1D, blue filled triangles). This result indicated the absence of membrane resealing and validated the assay. When BeWo ST were submitted to the same irradiation conditions in the presence of 1-mM Ca^{2+} , these cells exhibited an increase of intracellular fluorescence limited to an area of a few μ m² around the disruption site (Fig. 1C). The FM1–43 fluorescence intensity was observed to increase for a few seconds and then to reach a plateau (Fig. 1D, blue empty circles), indicating that cell membrane resealed rapidly. In the absence of Ca^{2+} , BeWo ST are unable to reseat their plasma membrane (Fig. S2), indicating that membrane resealing is also strictly Ca^{2+} -dependent in these cells. In order to characterize the membrane resealing process, the magnitude (A) and the rate ($\tau_{1/2}$) of FM1–43 uptake were determined (Fig. 1E). A and $\tau_{1/2}$ are respectively about eight and fifteen times lower for BeWo ST compared to BeWo CT. These two parameters indicate an enhanced ability of BeWo ST to reseat damaged plasma membrane.

The membrane repair assay was applied to human primary trophoblastic cells isolated from term placenta of healthy mothers. Primary CT differentiate and fuse spontaneously over three days of culture. Membrane repair ability of primary CT and ST were therefore investigated 24 h and 72 h after seeding, respectively. Primary trophoblasts behaved like BeWo cells, both of them are able to reseat their plasma membrane, with a more efficient repair for ST (Fig. 1D, black empty circles, and Fig. S3) compared to CT (Fig. 1D, black filled circles, and Fig. S3). We observed that the A and $\tau_{1/2}$ parameters are higher for primary cells compared to BeWo cells (Fig. 1E), indicating a faster process of resealing in BeWo cells. Many cell debris were observed in the medium during the assay (Fig. S3, arrowheads), suggesting a high fragility of primary cells. For this reason, we performed most of the further experiments with BeWo cells.

3.2. AnxA5 expression in human trophoblasts

By Western-blot analysis, we examined the relative expression of AnxA5 in BeWo cells and in human primary trophoblasts at the cyto- and syncytio-trophoblastic levels. AnxA5 is expressed at a similar level in BeWo CT and BeWo ST (Fig. 2A, left-hand lanes). The amount of endogenous AnxA5 was estimated at 3.5-ng/ μ g protein extract in both cell states. Primary CT and ST also expressed AnxA5 in a similar level with a concentration about three times higher than BeWo cells (Fig. 2A, middle lanes). We conclude therefore that AnxA5 is expressed at similar level in human CT and ST.

3.3. Subcellular distribution of endogenous AnxA5 in human trophoblasts

As we previously proposed that the formation of AnxA5 2D array at plasma membrane damaged sites was responsible for a strengthening of the membrane preventing the expansion of membrane tears [22], we investigated the subcellular localization of endogenous AnxA5 in intact and membrane-damaged BeWo cells. In intact cells, we observed that AnxA5 localizes in the nucleus and in the cytoplasm of BeWo CT (Fig. 2B, upper line) and BeWo ST (Fig. 2B, bottom line), in agreement with previous studies in BeWo cells [46] and other cell lines [47]. Primary CT and ST displayed the same subcellular localization of AnxA5 (Fig. S4). The homogenous distribution of AnxA5 within the cytoplasm supposes that it localizes in the cytosol. Some BeWo CT exhibited a stronger staining along the plasma membrane, exclusively localized at the cell–cell contacts (Fig. 2B, top left, arrowheads). This result correlates with a pleated shape of plasma membrane, as observed in DIC microscopy (Fig. 2B, top right, arrowheads). This stronger staining most

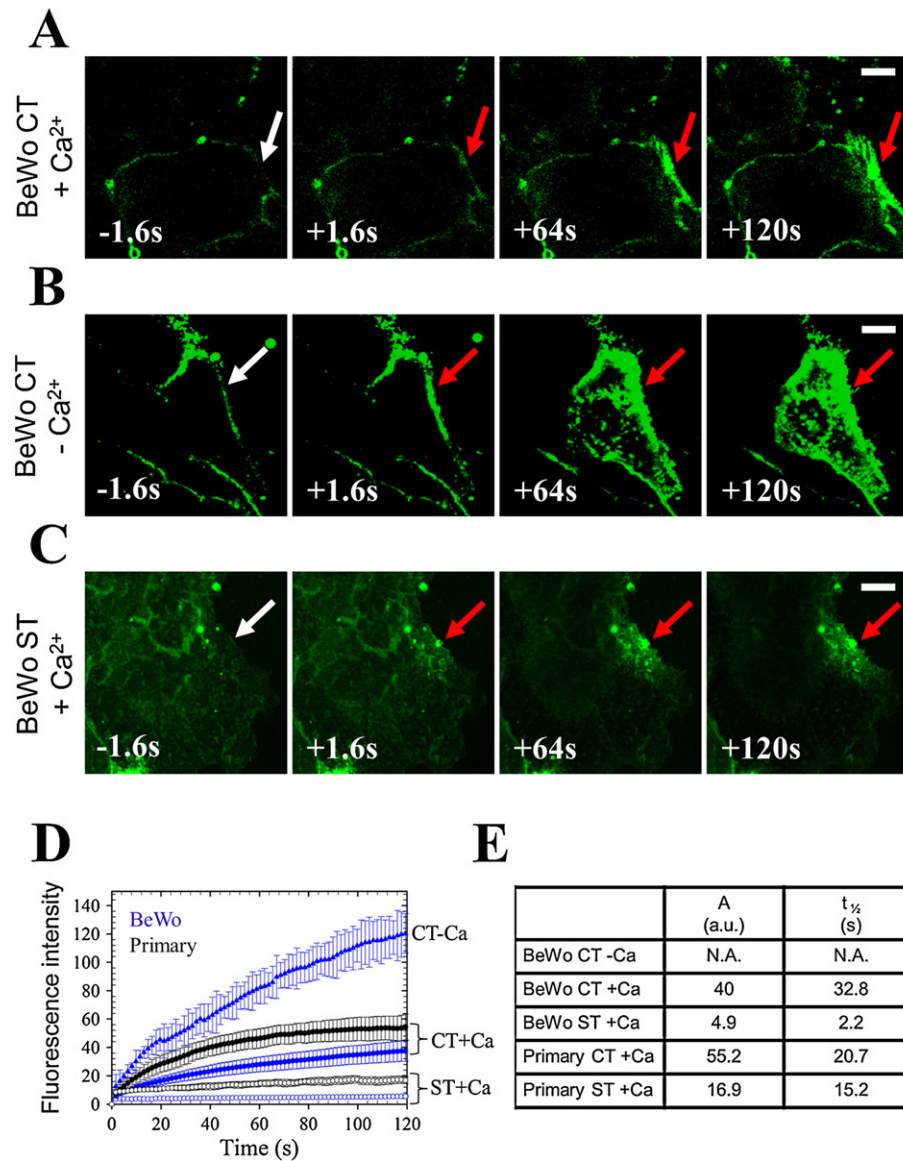


Fig. 1. Responses of human trophoblasts to membrane injury by laser irradiation. (A) Sequence of representative images showing the response of a BeWo CT to 110-mW infrared laser irradiation in the presence of 1 mM Ca^{2+} . (B) Sequence of representative images showing the response of a BeWo CT to 110-mW infrared laser irradiation in the presence of 1 mM EGTA. Before irradiation, cells were washed 3 times in D-PBS devoid of Ca^{2+} and subsequently incubated in D-PBS supplemented with 1 mM EGTA for 5-min. (C) Sequence of representative images showing the response of a BeWo ST to 110-mW infrared laser irradiation in the presence of 1 mM Ca^{2+} . In all Figures, the area of membrane irradiation is marked with a white arrow before irradiation and a red arrow after irradiation. Image frames 1 and 2 were recorded 1.6 s before and 1.6 s after irradiation, respectively; Image frames 3–4 were recorded 64 s and 120 s after irradiation, respectively, as indicated. Scale bars = 20 μm . (D) Kinetic data represent the FM1–43 fluorescence intensity integrated over whole cell sections, averaged for 30 cells (\pm SD) and 100 cells (\pm SD) for primary and BeWo cells, respectively. In the presence of 1-mM Ca^{2+} (+Ca), the fluorescence intensities reach a plateau within the time of experiment for BeWo CT (blue filled circles), BeWo ST (blue empty circles), primary CT (black filled circles) and primary ST (black empty circles) indicating cell membrane reseals. In the absence of Ca^{2+} (–Ca), the fluorescence intensity measured in BeWo CT (blue filled triangles) increases continuously and is significantly larger than for the four other conditions. This result indicates the absence of membrane resealing. (E) Fluorescence intensity changes (mean values from (D)) were fitted according to the “mono-exponential rise to maximum” equation. A and $\tau_{1/2}$ refer respectively to the maximal fluorescence intensity and the time required to observe the half-maximum fluorescence intensity. N.A. and a.u. stand for “not applicable” and “arbitrary unit”, respectively. A and $\tau_{1/2}$ are systematically lower for ST compared to CT, indicating an enhanced ability of ST to reseal damaged plasma membrane.

likely corresponds to a larger thickness at the contact region between two cells rather than a membrane localization.

We then assessed the subcellular localization of AnxA5 in laser-injured BeWo cells. Most previous studies dealing with the dynamics of intracellular proteins during cell membrane rupture and repair, have been based on the use of fluorescent fusion proteins [12,16,23]. Nevertheless, it remains elusive how an endogenous protein coupled to a 30-kDa fluorescent protein may fully conserve its traffic and protein interaction properties within the cell. Here we opted for studying resident endogenous AnxA5 using tools developed for correlative microscopy. BeWo cells were cultured in glass bottom dishes equipped with a square-patterned coverslip displaying an alphanumeric code in each

square, thus enabling accurate tracking of irradiated cells. After irradiation, cells were fixed, permeabilized and immunostained for AnxA5. The localization of AnxA5 was studied for various time intervals (from 5 to 15-min) between irradiation and fixation. 5-min after laser injury, endogenous AnxA5 was found to accumulate specifically at the disruption site of BeWo CT and ST (Fig. 2C, upper frames). Strikingly, the presence of AnxA5 at the rupture site was retained in about 50% of cells fixed 15-min after plasma membrane disruption (Fig. 2C, bottom frames). When similar experiments were performed in buffer devoid of Ca^{2+} , we did not detect the presence of AnxA5 at the disrupted site, indicating its recruitment is strictly Ca^{2+} -dependent (data not shown). It has been reported that intracellular Ca^{2+} concentration drops rapidly to its initial

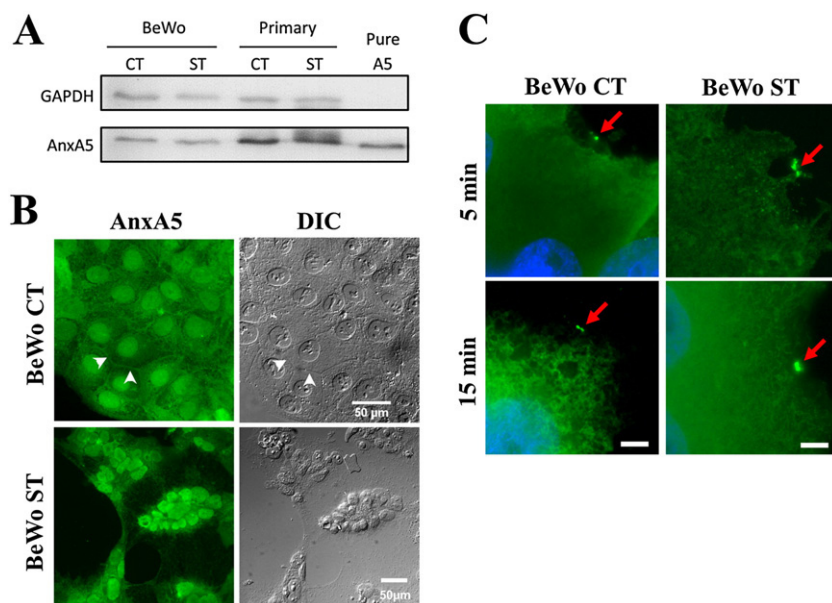


Fig. 2. Expression and subcellular distribution of endogenous AnxA5 in intact and damaged human trophoblasts. (A) The cellular content of AnxA5 in BeWo CT, BeWo ST, primary CT and primary ST was quantified through Western blot analysis, by comparison with 50-ng purified recombinant AnxA5 (Pure A5). 10- μ g protein extract were separated on a 10% SDS-PAGE. AnxA5 and GAPDH (loading control) were respectively detected with a mouse anti-AnxA5 monoclonal antibody and a rabbit anti-GAPDH monoclonal antibody. The amount of endogenous AnxA5 was estimated at 3.5 ng/ μ g protein extract and 10 ng/ μ g protein extract in BeWo cells and primary trophoblasts, respectively. (B) Subcellular localization of endogenous AnxA5 in intact BeWo CT (upper line) and intact BeWo ST (bottom line) was analyzed by immunocytofluorescence. Cells were observed by fluorescence microscopy for AnxA5 (green) and by differential interference contrast microscopy (DIC). Scale bar = 50 μ m. (C) Subcellular localization of endogenous AnxA5 in damaged BeWo CT (left-hand column) and damaged BeWo ST (right-hand column) was analyzed by immunocytofluorescence. Cells were irradiated with a 110-mW infrared laser in D-PBS containing 1-mM Ca^{2+} and fixed in 4% paraformaldehyde solution 5-min (upper panels) and 15-min (bottom panels) after laser irradiation was completed. Cells were immunostained for AnxA5 (green) and counterstained with DAPI (blue). The area of membrane irradiation is marked with a red arrow. Scale bar = 10 μ m.

level (μ M range) as early as a few seconds after membrane resealing [11, 12]. Given that AnxA5 is known to be released from the membrane when Ca^{2+} concentration falls below 0.2-mM [48], its presence at damaged membrane site several minutes after resealing suggests that it is trapped in poorly accessible environments. The size of the fluorescent area where AnxA5 accumulated remained constant with time, estimated at $4 (\pm 2)\text{-}\mu\text{m}^2$ and $6 (\pm 3)\text{-}\mu\text{m}^2$ for BeWo CT and BeWo ST, respectively. As we did not observe interaction between AnxA5 and plasma membrane anywhere else in the irradiated cells, we conclude that resident endogenous AnxA5 binds exclusively to the disruption site of laser-injured plasma membrane.

When laser-injured BeWo CT and BeWo ST (data not shown) were immunostained for AnxA5 without the permeabilization step, we observed that a significant part of AnxA5 was accessible to antibodies at the level of disruption site (Fig. 3). The possibility that antibodies entered the cell due to the action of paraformaldehyde was ruled out by the absence of staining at other places than the disrupted site. We observed that the size of fluorescent areas formed by endogenous AnxA5 at disrupted sites in permeabilized (Fig. 2C) and non-permeabilized cells (Fig. 3, around $4\text{-}\mu\text{m}^2$) were similar. This result indicates that, among the AnxA5 molecules accumulating at the disrupted site, a large part of them either interacts with the outer leaflet of the plasma membrane as soon as the disruption occurs or interacts with the inner leaflet when rupture is occurring and is excluded from the cytosol when membrane reseals.

3.4. Binding of extracellular AnxA5 to human intact and damaged trophoblasts

Some studies have reported the existence of AnxA5 in the extracellular milieu [49,50]. In the human placenta, it has been suggested that extracellular AnxA5 may cover the ST layer [51], preventing blood coagulation [52]. We investigated therefore whether AnxA5 molecules were constitutively associated with the outer leaflet of the plasma membrane in non-injured BeWo and primary CT and ST. Live cells were incubated

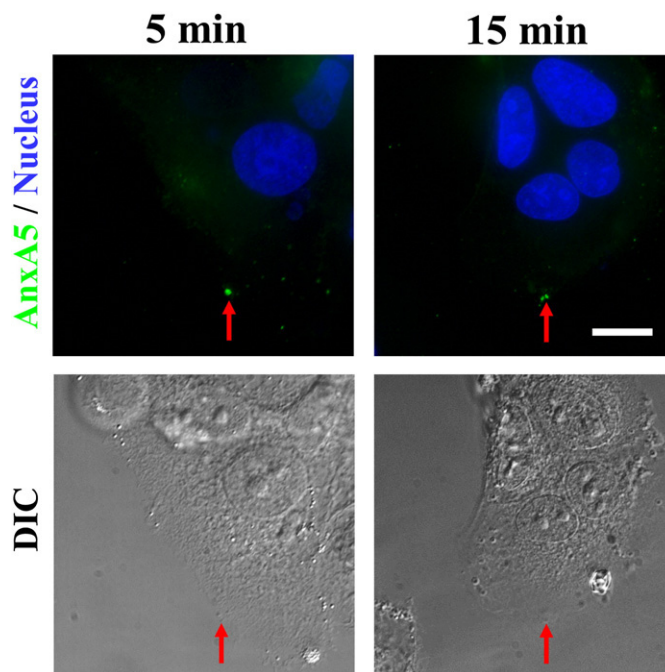


Fig. 3. Subcellular localization of endogenous AnxA5 in un-permeabilized laser-injured BeWo cells. Subcellular localization of endogenous AnxA5 in damaged BeWo CT was analyzed by immunocytofluorescence without the permeabilization step. Cells were irradiated with a 110-mW infrared laser in D-PBS containing 1-mM Ca^{2+} and fixed in 4% paraformaldehyde solution 5-min (left-hand column) and 15-min (right-hand column) after laser irradiation was completed. Cells were immunostained for AnxA5 (green) and counterstained with DAPI (blue). The area of membrane irradiation is marked with a red arrow. Scale bar = 20 μ m.

45-min with fluorescent monoclonal antibody directed against AnxA5 in the presence of 1-mM Ca^{2+} . Incubation was performed at 4 °C in order to prevent, or slow down, endocytosis and to reduce unspecific entry of antibody into the cell. In these conditions, most BeWo CT showed no fluorescence at all (Fig. 4A). The only few BeWo CT that were labeled displayed an altered morphology, characteristic of an apoptotic or necrotic state (Fig. 4A, arrow). Control experiment confirmed the capacity of anti-AnxA5 antibody to interact with AnxA5 in these conditions of incubation (Fig. 4B). Similar results were found with primary CT (Fig. 4C) and ST (Fig. 4D), which allow us to conclude that AnxA5 is not constitutively present *ex vivo* at the surface of non-injured CT and ST.

In order to analyze the behavior of extracellular AnxA5 during cell membrane rupture, we irradiated BeWo cells in the presence of exogenously-added Cy5-AnxA5. Before membrane rupture, no AnxA5 staining was observed, indicating the absence of free PS exposed at the cell surface (Fig. 5, frame 1). As soon as 1.6-s after laser-injury of BeWo CT, extracellular AnxA5 was observed localizing exclusively at the disrupted site (Fig. 5, frame 2). Extracellular AnxA5 continued to accumulate at the disruption site for at least 1-min after laser irradiation (Fig. 5, frame 3–4). Similar results were obtained with BeWo ST (Fig. S5).

Since intact ST and CT do not expose PS at the cell surface, we conclude that binding of exogenous AnxA5 to membrane damaged areas in laser-irradiated cells reflects the transient and local exposure of PS molecules present in the inner leaflet of the plasma membrane.

We conclude also that both endogenous and exogenous AnxA5 molecules are able to be recruited at disruption site within 2- s after membrane injury.

3.5. Membrane repair ability of human AnxA5-deficient trophoblasts

In order to investigate the possible consequences of the absence of endogenous AnxA5 for membrane repair in trophoblastic cells, BeWo CT were transfected with AnxA5-targetting siRNAs. 48-h after two successive siRNA transfections, the content of endogenous AnxA5 in BeWo CT dropped by $90 \pm 6\%$ ($n = 7$), reaching a residual concentration of $0.3 (\pm 0.08)$ ng/ μg total protein extract (Fig. S6A). Immunocytochemistry analysis showed that transfected BeWo CT population was homogeneously affected by AnxA5 knock-down (Fig. S6B).

When siRNA-transfected BeWo CT were submitted to cell membrane disruption, two types of response were observed. Most of transfected BeWo CT (67%) exhibited a large and deep entry of FM1–43 (Fig. 6A, upper panel), characterized by a strong and continuous increase of intracellular fluorescence intensity during the time of

experiment (Fig. 6B, empty circles). This result indicates a defect of membrane resealing. The remaining 33% of cells behaved like un-transfected BeWo CT with an entry of FM1–43 limited to an area close to the plasma membrane (Fig. 6A, bottom panel), and a plateau of intracellular fluorescence intensity after about 100-s (Fig. 6B, filled circles); the repair kinetic parameters of these cells (Fig. 6C) were similar to those measured for un-transfected cells (Fig. 1E). The fact that about one third of cells within transfected cell population showed an efficient repair is likely to reflect the fact the transfection yield is not 100% and that some cells conserve a residual concentration of AnxA5 sufficient for achieving membrane resealing. We conclude therefore that the absence of endogenous AnxA5 leads to a defect of membrane repair in BeWo CT.

Several strategies were developed in order to establish AnxA5-deficient BeWo ST. We first tried to transfect BeWo CT with AnxA5-targetting siRNAs and subsequently to induce cell fusion by the addition of 8-BrcAMP. These cells were unable to fuse (data not shown). This observation indicates that AnxA5 may play a role in fusion of trophoblastic cells as it was proposed for myoblasts [53]. We also tried to transfect BeWo ST directly. However, the short lifetime of BeWo ST, together with their relative fragility, prevented us from obtaining a significant amount of viable cells. In addition BeWo ST surviving transfection steps exhibited a low decrease (inferior to 5%) of endogenous AnxA5 amount (data not shown). In order to overcome this problem, we decided to use shRNA lentiviral transduction strategy, which is particularly adapted for non-dividing cells. When BeWo ST were transduced with AnxA5-targetting shRNA lentiviral particles, we observed that most cells (75%) were unable to reseal laser-injured plasma membrane (Fig. 7A, upper panels and Fig. 7B, blue empty circles). Membrane repair was observed for the remaining 25% of cells (Fig. 7A, bottom panels and Fig. 7B, blue filled circles), which nevertheless exhibited a slower resealing characterized by kinetic parameters with $A = 24.9$ a.u. and $\tau_{1/2} = 11.5$ s (Fig. 7C, A5-shRNA, 25%) instead of 9.8 a.u. and 10.2 s for BeWo ST transduced with lentiviral particles containing a scrambled shRNA sequence (Fig. 7B, black filled circles and Fig. 7C, ctrl).

We conclude that the absence of endogenous AnxA5 in human trophoblasts, at both CT and ST levels, leads to a defect in membrane repair.

3.6. Which mechanism ensures lesion removal in human trophoblasts?

During the course of this study we made the following observation that provides novel insight on the process of lesion removal. We observed with about half of BeWo and primary ST that the lipid material accumulated at the disrupted site was released from the cell after membrane resealing (Fig. 8). Two *modus operandi* were observed: either a

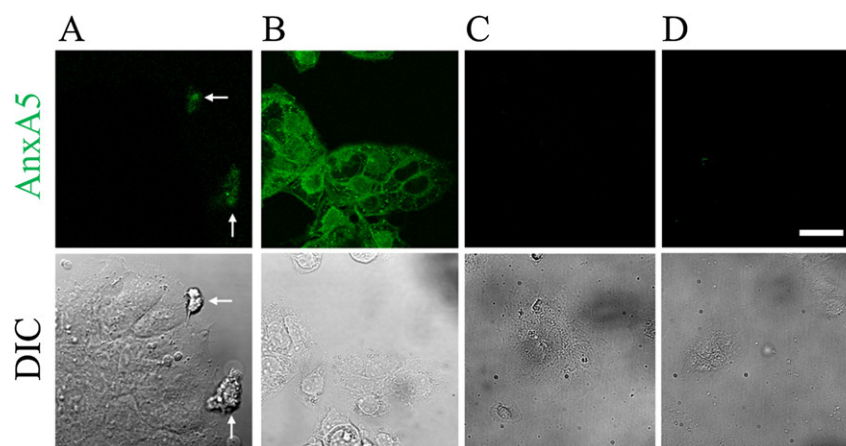


Fig. 4. Assessment of the presence of AnxA5 at the surface of human trophoblasts. Living BeWo CT (A and B) and primary CT (C) and ST (D) were incubated with monoclonal anti-AnxA5 antibody coupled to Alexa-488 for 45-min at 4 °C in the presence of Ca^{2+} (A, C and D). As control, a batch of BeWo CT was fixed, permeabilized and immunostained for AnxA5 in the same conditions (B). White arrows point out two cells and/or cell debris floating in the medium. No AnxA5 was detectable at the surface of human trophoblasts *ex vivo* (A, C and D). Scale bar = 40 μm .

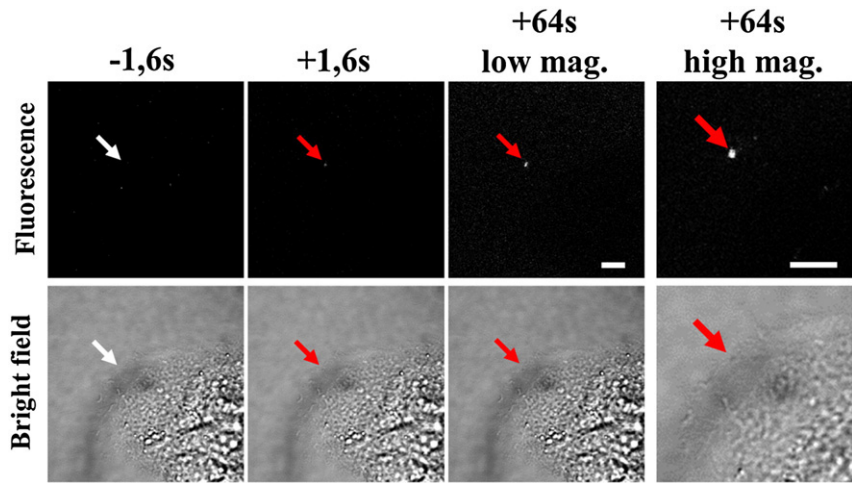


Fig. 5. Binding of extracellular AnxA5 to the disrupted site of injured membrane. Simultaneous recording in fluorescence microscopy (upper panels) and bright field microscopy (bottom panels) of a BeWo CT submitted to 110-mW laser-induced membrane rupture in the presence of 3- μ g/ml Cy5-AnxA5 (white) diluted in D-PBS containing 1-mM Ca^{2+} . The area of membrane irradiation is marked with a white arrow before irradiation and a red arrow after irradiation. Image frames 1 and 2 were recorded 1.6 s before and 1.6 s after irradiation, respectively; Image frames 3 and 4 were recorded 64 s after irradiation. Image frame 4 is a high-magnified image from frame 3. Extracellular AnxA5 binds exclusively at the disrupted site of the injured membrane. Scale bars = 20 μ m.

large fragment (about 100- μm^2) containing the wounding site moved away from the cell (Fig. 8A) or the area containing the disrupted site crumbled through membrane debris (about 5- μm^2) release (Fig. 8B

and C). We observed that release of lipid material from the disrupted area began from 1-min or later after membrane disruption (Fig. 8, see also Fig. 1C), indicating that this process may correspond, not to

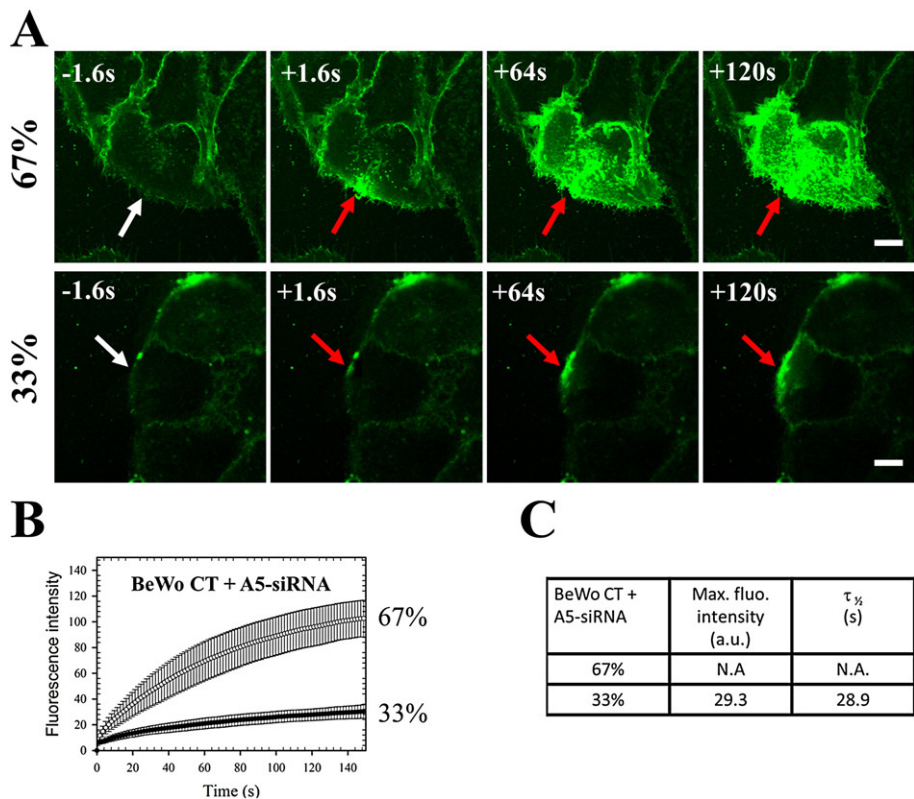


Fig. 6. Responses of AnxA5-deficient BeWo CT to cell membrane injury. (A) Sequences of representative images showing the response of BeWo CT transfected with AnxA5-targeting siRNA to 110-mW infrared-laser irradiation in the presence of 1-mM Ca^{2+} . Image series show two types of response: a minor fraction (about 33%, bottom panels) responds as observed for un-transfected cells with an entry of FM1-43 limited to a small area near the disruption site. A major fraction (about 67%, upper panels) presents a large increase of intracellular fluorescence intensity indicating the absence of membrane resealing. The area of membrane irradiation is marked with a white arrow before irradiation and a red arrow after irradiation. Image frames 1 and 2 were recorded 1.6 s before and 1.6 s after irradiation, respectively; Image frames 3–4 were recorded 64 s and 120 s after irradiation, respectively. Scale bars = 20 μ m. (B) Kinetic data represent the FM1-43 fluorescence intensity integrated over whole cell sections, averaged for about 100 cells (+/- SD). For the minor fraction (33%, filled circles), the fluorescence intensity reaches a plateau within the time of experiment indicating cell membrane reseals. For the major fraction (67%, empty circles), the fluorescence intensity measured in AnxA5-targeting siRNA transfected BeWo CT increases continuously indicating the absence of membrane resealing. Fluorescence intensity changes (data from (B)) were fitted according to the “mono-exponential rise to maximum” equation. Mean values from membrane repair assays were used for this curve fitting. N.A. and a.u. stand for “not applicable” and “arbitrary unit”, respectively.

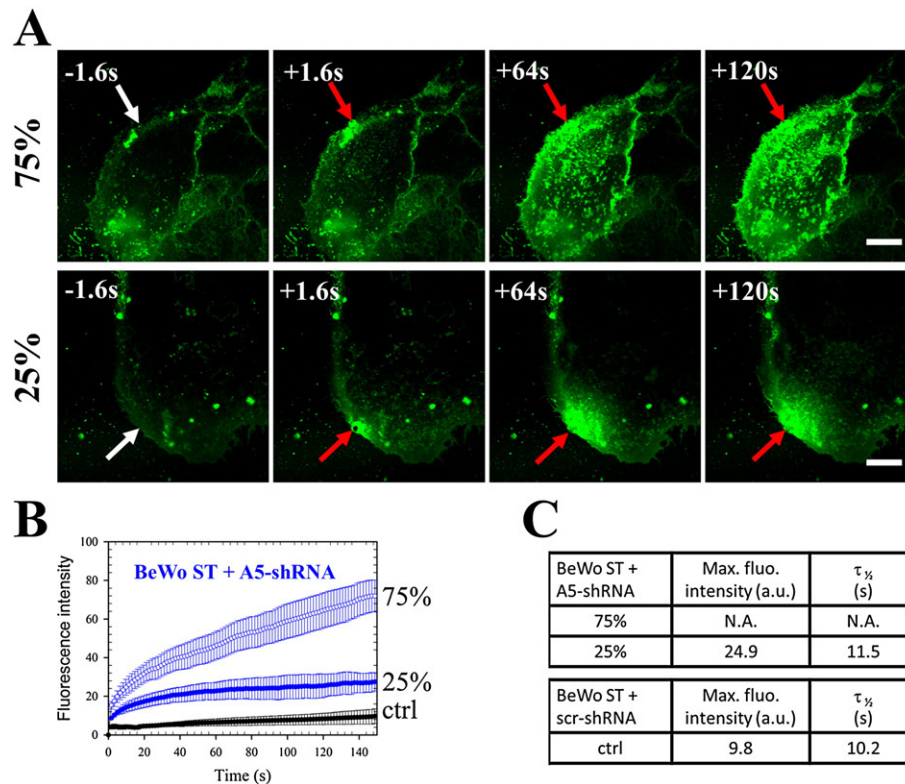


Fig. 7. Responses of AnxA5-deficient BeWo ST to cell membrane injury. (A) Sequences of representative images showing the response of BeWo ST transduced with lentiviral particles containing AnxA5-targeting shRNA to 110-mW infrared-laser irradiation in the presence of 1-mM Ca^{2+} . Image series show two types of response: a minor fraction (about 25%, bottom panels) exhibits an increase of intracellular fluorescence, which stops within 1-min, indicating cell membrane reseals. A major fraction (about 75%, upper panels) presents a large increase of intracellular fluorescence intensity indicating the absence of membrane resealing. The area of membrane irradiation is marked with a white arrow before irradiation and a red arrow after irradiation. Image frames 1 and 2 were recorded 1.6 s before and 1.6 s after irradiation, respectively; Image frames 3–4 were recorded 64 s and 120 s after irradiation, respectively. Scale bars = 20 μm . (B) Kinetic data represent the FM1–43 fluorescence intensity integrated over whole cell sections, averaged for about 30 cells (\pm SD). For the minor fraction of BeWo ST transduced with AnxA5-shRNA (A5-shRNA) lentiviral particles (25%, blue filled circles), the fluorescence intensity reaches a plateau within the time of experiment indicating cell membrane reseals. For the major fraction (75%, blue empty circles), the fluorescence intensity increases continuously indicating the absence of membrane resealing. Kinetic data representing the response of BeWo ST transduced with lentiviral particles containing a scrambled shRNA are displayed (ctrl, black filled circles). (C) Fluorescence intensity changes (data from (B)) were fitted according to the “mono-exponential rise to maximum” equation. The parameters were calculated for kinetic data of BeWo ST transduced with AnxA5-shRNA (A5-shRNA, 25%) and scrambled shRNA (scr-shRNA, ctrl) lentiviral particles, which exhibited membrane resealing. Mean values from membrane repair assays were used for this curve fitting. N.A. and a.u. stand for “not applicable” and “arbitrary unit”, respectively.

resealing mechanism, but to lesion removal. The 50% of remaining BeWo ST and all BeWo CT exhibited no beginning of wounded membrane release within the 2-min range of the membrane repair assay. Further investigations are required to determine what happens for these cells over a longer period.

4. Discussion

4.1. Human trophoblasts present an efficient repair machinery

The present study shows that ST reseal cell membrane disruption of μm^2 -size within 30-s. This fast membrane resealing highlights the critical role of membrane repair processes for ST. Indeed, these syncytial cells, which form the outer layer of the trophoblastic tissue and protrude as finger-shaped villi in maternal blood, require protection and repair mechanisms in order to counteract the mechanical constraints induced by the shearing forces exerted by maternal circulation. Furthermore, ST are submitted to the continuous supply of cellular material provided by the fusion of underlying CT. Aging cytoplasmic content and nuclei are clustered and shed into the maternal circulation through ST-derived particles in 3–4 weeks [28,54]. It has been estimated that around 1×10^8 ST-derived particles are shed over the entire gestational period [25,29,31]. The molecular mechanism ensuring the formation of these particles and the required process of membrane repair after shedding, are poorly understood. A particular aspect to consider is that the various types of damages that may affect the ST plasma membrane

will result in the exposure of PS-containing membranes to maternal blood. In view of the pro-coagulant properties of PS-exposing membranes, efficient mechanisms of membrane repair must operate in the placenta to prevent onset of blood coagulation, which could be life-threatening for the fetus.

The present study shows also that CT, although they are not in contact with maternal blood, reseal cell membrane disruption of μm^2 -size within 100-s. The development and regeneration of ST require the fusion of underlying CT. By providing ST with a large part of their cellular content, CT may offer the main components of the repair machinery. It is noteworthy that dysferlin, a major membrane repair protein in skeletal muscle, may be lacking in CT [32]. This finding raises the essential issue of the role played by dysferlin in membrane repair in these cells. The possibility that the absence of dysferlin may be compensated by the presence of myoferlin [55] should be investigated.

4.2. AnxA5 promotes membrane resealing in human trophoblasts

Annexins have been shown to participate in membrane repair processes in numerous studies [20–23]. In this study, we focused our attention on AnxA5, because it is expressed at high level in the placenta, and because we reported previously its role in membrane resealing in murine perivascular cells [22]. CT and ST, rendered deficient in AnxA5 by RNA interference, suffer from a severe defect in membrane resealing, indicating that AnxA5 is a crucial component of the repair machinery in human trophoblasts. In a few seconds after membrane injury,

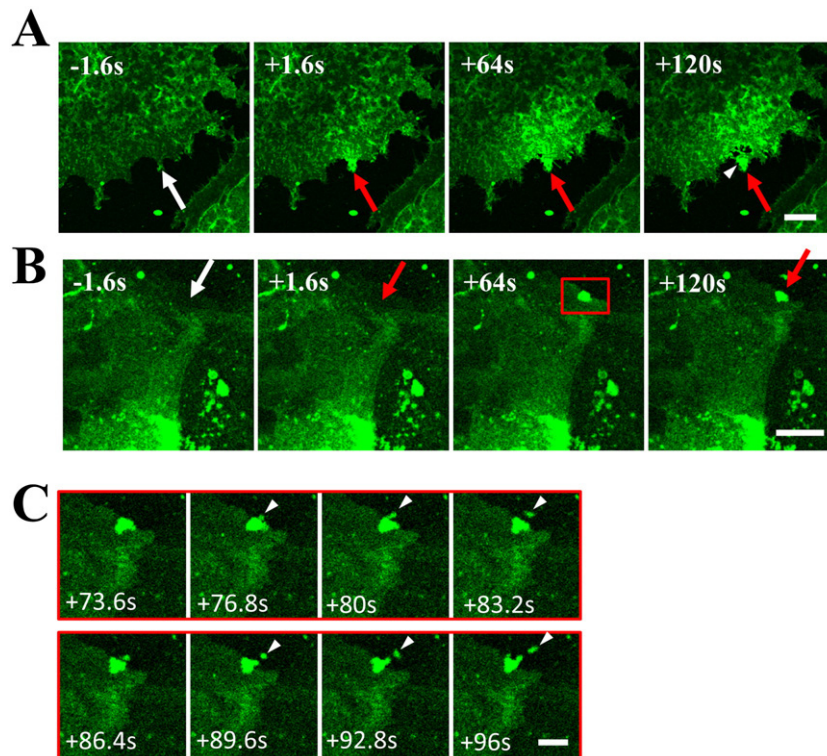


Fig. 8. Lesion removal of BeWo ST after cell membrane injury. (A) and (B) display two sequences of representative images showing two types of lesion removal from the disruption site of laser-injured BeWo ST. Cell membrane injury was performed through 110-mW infrared laser irradiation in the presence of 1 mM Ca^{2+} . In all figures, the area of membrane irradiation is marked with a white arrow before irradiation and a red arrow after irradiation. Image frames 1 and 2 were recorded 1.6 s before and 1.6 s after irradiation, respectively; Image frames 3–4 were recorded 64 s and 120 s after irradiation, respectively. In (A) the white arrowhead point out the removal of a large membrane fragment containing the disrupted site. In (B) the red square surrounds the area displayed in (C). Scale bar = 20 μm . (C) Two different time lapses showing the shedding of two successive membrane-derived debris (white arrowheads) from the disrupted site of the laser-injured BeWo ST displayed in (B). Scale bar = 10 μm .

endogenous AnxA5 is specifically recruited, in a Ca^{2+} -dependent manner, to the disruption site, where it is retained several minutes after membrane resealing. This result is consistent with the model we have proposed previously [22]. AnxA5, triggered by the local increase in Ca^{2+} entering the cell at mM-concentration, binds to PS molecules exposed at the edges of torn membranes, where it may self-assemble into 2D arrays. The formation of AnxA5 2D array may strengthen the membrane and prevent the expansion of the tear, by counteracting membrane tension due to the cortical cytoskeleton. The intracellular Ca^{2+} concentration has been found to drop rapidly after membrane resealing [11,12], at a level that is incompatible with AnxA5 binding to PS. The presence of AnxA5 several minutes after membrane resealing, suggests therefore it is trapped in a lipid environment where Ca^{2+} remains at mM concentration.

4.3. Which mechanisms ensure membrane resealing and lesion removal?

In wounded human trophoblasts, a large amount of lipid material accumulating at the disrupted site is detected as early as a few seconds after membrane disruption. Even if the nature of accumulating lipid material is not determined in our experiments, the variation of intracellular FM1–43 fluorescence intensity (see for instance Fig. 1C) suggests the cytoplasmic origin of this lipid material. Two main models of cell membrane repair are currently proposed. The classical model relies on Ca^{2+} -triggered fusion of intracellular vesicles, which may form a lipid patch enabling membrane resealing via an exocytosis-like process [5, 7,8]. Besides, a new model has been recently proposed: Ca^{2+} entry through membrane disruption triggers exocytosis of lysosomes, which secrete acid sphingomyelinase in the extracellular milieu. Subsequently, hydrolysis of phosphorylcholine head group of sphingomyelin activates endocytosis, which mediates lesion removal [56,57]. It is unlikely that the fast membrane resealing observed in ST may be accomplished

through ceramide-driven invagination induced by exocytosis of lysosomal enzymes. For instance, it was observed that secretion of significant amount of acid sphingomyelinase can take up to several minutes [57], inconsistent with a fast membrane resealing, in the second range. In addition, through specific binding to the disrupted site as early as a few seconds after membrane disruption, AnxA5 is a good reporter of the lesion fate. In most trophoblasts, AnxA5 is retained at the irradiated membrane region several minutes after membrane resealing. All together, these results prompt to propose that the formation of a lipid patch is likely responsible for membrane resealing in human trophoblasts.

Concerning the lesion removal in injured human trophoblasts, we frequently observed the shedding either of a large piece (about 100- μm^2) including the disrupted site or of burst of μm^2 -size membrane debris from the lesion. This lesion removal begins at the earliest 1-min after membrane wounding. If released particles were already detected from SLO-perforated HEK293 cells [58], we report here, to our knowledge, the first direct evidence of the release of the plasma membrane wound.

5. Concluding remarks

Here we show that AnxA5 plays a central role in trophoblast membrane repair by promoting membrane resealing. We propose that the resealing process is primarily based on the formation of a lipid patch and that the lesion removal is managed through the release into the extracellular milieu of membrane material containing the wounded site. Whatever the membrane repair mechanism, we propose that AnxA5 achieves a universal and ubiquitous function, strengthening wounded plasma membrane through an early binding to the disrupted site after membrane injury. This binding prevents the extension of the tear by counteracting membrane tension due to the cortical cytoskeleton.

Several annexins have been shown to participate in plasma membrane repair [20–23,59], suggesting the annexin family forms an emergency team that orchestrates the cell membrane repair machinery, by protecting cells against the direct and collateral effects of plasma membrane rupture. Implication of other annexins, apart from AnxA5, in trophoblast membrane repair remains to be investigated. Furthermore, similarities and differences in mechanisms ensuring membrane repair in trophoblasts and other cell types remain elusive. Most studies dealing with membrane repair have focused until now on skeletal muscle, since it has been demonstrated that defect in membrane repair leads to muscular dystrophy [13,14,24]. Although a relationship between defective membrane repair and placental pathologies has not yet been clearly established, it is noteworthy that severe pre-eclampsia is associated with an expression of the trophoblastic dysferlin, a major component of the muscle repair machinery, dropped by 38% [38].

Acknowledgments

We thank Guillaume Pidoux and Pascale Gerbaud from Inserm S1139 UMR–Paris Descartes University for fruitful discussions. The fluorescence microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center a service unit of the CNRS–INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France Biolmaging. The help of Christel Poujol, Philippe Legros and Sébastien Marais is acknowledged. Lentiviral-based particles were produced by Bordeaux University lentiviral vectorology platform (US005, Bordeaux, France). The help of Alice Bibeyran, Véronique Guyonnet Dupérat and François Moreau-Gaudry is acknowledged. The project was supported by ANR (grant ANR-11-BSV1-0035 to A.R.B.) and by AFM–Téléthon (grant AFM–téléthon-17140 to A.B.).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2014.12.038>.

References

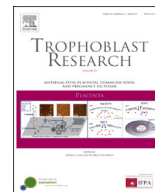
- [1] R.A. Steinhardt, G. Bi, J.M. Alderton, Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release, *Science* 263 (1994) 390–393.
- [2] P.L. McNeil, R.A. Steinhardt, Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19 (2003) 697–731.
- [3] P.L. McNeil, T. Kirchhausen, An emergency response team for membrane repair, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 499–505.
- [4] A. Draeger, E.B. Babychuk, Ceramide in plasma membrane repair, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2013) 341–353.
- [5] K. Miyake, P.L. McNeil, Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption, *J. Cell Biol.* 131 (1995) 1737–1745.
- [6] M. Terasaki, K. Miyake, P.L. McNeil, Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca^{2+} -dependent vesicle-vesicle fusion events, *J. Cell Biol.* 139 (1997) 63–74.
- [7] P.L. McNeil, S.S. Vogel, K. Miyake, M. Terasaki, Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 11) (2000) 1891–1902.
- [8] G.Q. Bi, J.M. Alderton, R.A. Steinhardt, Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing, *J. Cell Biol.* 131 (1995) 1747–1758.
- [9] N.W. Andrews, P.E. Almeida, M. Corrotte, Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 734–742.
- [10] E.B. Babychuk, K. Monastyrskaya, S. Potez, A. Draeger, Blebbing confers resistance against cell lysis, *Cell Death Differ.* 18 (2011) 80–89.
- [11] E.B. Babychuk, K. Monastyrskaya, S. Potez, A. Draeger, Intracellular Ca^{2+} operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 1126–1134.
- [12] A.J. Jimenez, P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel, F. Perez, ESCRT machinery is required for plasma membrane repair, *Science* 343 (2014) 1247136.
- [13] J. Liu, M. Aoki, I. Illa, C. Wu, M. Fardeau, C. Angelini, C. Serrano, J.A. Urtizberea, F. Hentati, M.B. Hamida, S. Bohlega, E.J. Culper, A.A. Amato, K. Bossie, J. Oeltjen, K. Bejaoui, D. McKenna-Yasek, B.A. Hosler, E. Schurr, K. Arahata, et al., Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy, *Nat. Genet.* 20 (1998) 31–36.
- [14] D. Bansal, K. Miyake, S.S. Vogel, S. Groh, C.-C. Chen, R. Williamson, P.L. McNeil, K.P. Campbell, Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy, *Nature* 423 (2003) 168–172.
- [15] L. Glover, R.H. Brown, Dysferlin in membrane trafficking and patch repair, *Traffic* 8 (2007) 785–794.
- [16] C. Cai, H. Masumiya, N. Weisleder, N. Matsuda, M. Nishi, M. Hwang, J.-K. Ko, P. Lin, A. Thornton, X. Zhao, Z. Pan, S. Komazaki, M. Brotto, H. Takeshima, J. Ma, MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery, *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 56–64.
- [17] Y. Huang, S.H. Laval, A. van Remoortere, J. Baudier, C. Benaud, L.V.B. Anderson, V. Straub, A. Deelder, R.R. Frants, J.T. den Dunnen, K. Bushby, S.M. van der Maarel, AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration, *FASEB J.* 21 (2007) 732–742.
- [18] L.V. Anderson, R.M. Harrison, R. Pogue, E. Vafiadaki, C. Pollitt, K. Davison, J.A. Moss, S. Keers, A. Pyle, P.J. Shaw, I. Mahjneh, Z. Argov, C.R. Greenberg, K. Wroegemann, T. Bertorini, H.H. Goebel, J.S. Beckmann, R. Bashir, K.M. Bushby, Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies), *Neuromuscul. Disord.* 10 (2000) 553–559.
- [19] T. Chrobáková, M. Hermanová, I. Kroupová, P. Vondráček, T. Maríková, R. Mazanec, J. Zámecník, J. Stanek, M. Havlová, L. Fajkusová, Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome, *Neuromuscul. Disord.* 14 (2004) 659–665.
- [20] N.J. Lennon, A. Kho, B.J. Bacska, S.L. Perlmutter, B.T. Hyman, R.H. Brown, Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 50466–50473.
- [21] A.K. McNeil, U. Rescher, V. Gerke, P.L. McNeil, Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35202–35207.
- [22] A. Bouter, C. Gounou, R. Bérat, S. Tan, B. Gallois, T. Granier, B.L. d'Estaintot, E. Pöschl, B. Brachvogel, A.R. Brissou, Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair, *Nat. Commun.* 2 (2011) 270.
- [23] U. Roostalu, U. Strähle, In vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma, *Dev. Cell* 22 (2012) 515–529.
- [24] C. Minetti, F. Sotgia, C. Bruno, P. Scartezini, P. Broda, M. Bado, E. Masetti, M. Mazzocco, A. Egeo, M.A. Donati, D. Volonte, F. Galbiati, G. Cordone, F.D. Bricarelli, M.P. Lisanti, F. Zara, Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy, *Nat. Genet.* 18 (1998) 365–368.
- [25] K. Benirschke, P. Kaufmann, Pathology of the Human Placenta, Springer Science & Business Media, 2000.
- [26] D. Evain-Brion, A. Malassine, Human placenta as an endocrine organ, *Growth Hormon. IGF Res.* 13 (Suppl. A) (2003) S34–37.
- [27] W.W. Hay, Placental transport of nutrients to the fetus, *Horm. Res.* 42 (1994) 215–222.
- [28] B. Huppertz, H.G. Frank, J.C. Kingdom, F. Reister, P. Kaufmann, Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta, *Histochem. Cell Biol.* 110 (1998) 495–508.
- [29] G.J. Burton, C.J.P. Jones, Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta, *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 48 (2009) 28–37.
- [30] C. Salomon, M.J. Torres, M. Kobayashi, K. Scholz-Romero, L. Sobrevia, A. Dobierzewska, S.E. Illanes, M.D. Mitchell, G.E. Rice, A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration, *PLoS ONE* 9 (2014) e98667.
- [31] M.H. Abumaree, P.R. Stone, L.W. Chamley, An in vitro model of human placental trophoblast deportation/shedding, *Mol. Hum. Reprod.* 12 (2006) 687–694.
- [32] D.D. Vandré, W.E. Ackerman, D.A. Kniss, A.K. Tewari, M. Mori, T. Takizawa, J.M. Robinson, Dysferlin is expressed in human placenta but does not associate with caveolin, *Biol. Reprod.* 77 (2007) 533–542.
- [33] H. Alvarez, W.L. Benedetti, V.K. De Leonis, Syncytial proliferation in normal and toxemic pregnancies, *Obstet. Gynecol.* 29 (1967) 637–643.
- [34] K. Benirschke, The human placenta J D Boyd and W J Hamilton Heffer, Cambridge, 365 pp 1970, Teratology 8 (1973) 77–78.
- [35] M. Langbein, R. Strick, P.L. Strissel, N. Vogt, H. Parsch, M.W. Beckmann, R.L. Schild, Impaired cytotrophoblast cell–cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction, *Mol. Reprod. Dev.* 75 (2008) 175–183.
- [36] M. Johansen, C.W. Redman, T. Wilkins, I.L. Sargent, Trophoblast deportation in human pregnancy—its relevance for pre-eclampsia, *Placenta* 20 (1999) 531–539.
- [37] M. Knight, C.W. Redman, E.A. Linton, I.L. Sargent, Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105 (1998) 632–640.
- [38] C.T. Lang, K.B. Markham, N.J. Behrendt, A.A. Suarez, P. Samuels, D.D. Vandre, J.M. Robinson, W.E. Ackerman, Placental dysferlin expression is reduced in severe pre-eclampsia, *Placenta* 30 (2009) 711–718.
- [39] V. Gerke, S.E. Moss, Annexins: from structure to function, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 331–371.
- [40] M.J. Hayes, U. Rescher, V. Gerke, S.E. Moss, Annexin-actin interactions, *Traffic* 5 (2004) 571–576.
- [41] V. Gerke, C.E. Creutz, S.E. Moss, Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 449–461.
- [42] O. Lambert, V. Gerke, M.F. Bader, F. Porte, A. Brissou, Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy, *J. Mol. Biol.* 272 (1997) 42–55.
- [43] D.S. Drust, C.E. Creutz, Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium, *Nature* 331 (1988) 88–91.
- [44] J.L. Frendo, P. Th ron, T. Bird, N. Massin, F. Muller, J. Guibourdenche, D. Luton, M. Vidau, W.B. Anderson, D. Evain-Brion, Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation, *Endocrinology* 142 (2001) 3638–3648.
- [45] G.W. Humphrey, E. Mekhedov, P.S. Blank, A. de Morree, G. Pekurnaz, K. Nagaraju, J. Zimmerberg, GREG cells, a dysferlin-deficient myogenic mouse cell line, *Exp. Cell Res.* 318 (2012) 127–135.

- [46] X. Wang, B. Campos, M.A. Kaetzel, J.R. Dedman, Secretion of annexin V from cultured cells requires a signal peptide, *Placenta* 22 (2001) 837–845.
- [47] T. Skrahina, A. Piljić, C. Schultz, Heterogeneity and timing of translocation and membrane-mediated assembly of different annexins, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 1039–1047.
- [48] R.P. Richter, J.L.K. Him, B. Tessier, C. Tessier, A.R. Brisson, On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers, *Biophys. J.* 89 (2005) 3372–3385.
- [49] M.J. Flaherty, S. West, R.L. Heimark, K. Fujikawa, J.F. Tait, Placental anticoagulant protein-I: measurement in extracellular fluids and cells of the hemostatic system, *J. Lab. Clin. Med.* 115 (1990) 174–181.
- [50] J.F. Tait, M. Sakata, B.A. McMullen, C.H. Miao, T. Funakoshi, L.E. Hendrickson, K. Fujikawa, Placental anticoagulant proteins: isolation and comparative characterization four members of the lipocortin family, *Biochemistry* 27 (1988) 6268–6276.
- [51] G. Krikun, C.J. Lockwood, X.X. Wu, X.D. Zhou, S. Guller, C. Calandri, A. Guha, Y. Nemerson, J.H. Rand, The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation, *Placenta* 15 (1994) 601–612.
- [52] J.H. Rand, X.-X. Wu, Antibody-mediated interference with annexins in the antiphospholipid syndrome, *Thromb. Res.* 114 (2004) 383–389.
- [53] E. Leikina, K. Melikov, S. Sanyal, S.K. Verma, B. Eun, C. Gebert, K. Pfeifer, V.A. Lizunov, M.M. Kozlov, L.V. Chernomordik, Extracellular annexins and dynamin are important for sequential steps in myoblast fusion, *J. Cell Biol.* 200 (2013) 109–123.
- [54] T.M. Mayhew, Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation, *Histol. Histopathol.* 16 (2001) 1213–1224.
- [55] J.M. Robinson, W.E. Ackerman, N.J. Behrendt, D.D. Vandre, While dysferlin and myoferlin are coexpressed in the human placenta, only dysferlin expression is responsive to trophoblast fusion in model systems, *Biol. Reprod.* 81 (2009) 33–39.
- [56] V. Idone, C. Tam, J.W. Goss, D. Toomre, M. Pypaert, N.W. Andrews, Repair of injured plasma membrane by rapid Ca^{2+} -dependent endocytosis, *J. Cell Biol.* 180 (2008) 905–914.
- [57] C. Tam, V. Idone, C. Devlin, M.C. Fernandes, A. Flannery, X. He, E. Schuchman, I. Tabas, N.W. Andrews, Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair, *J. Cell Biol.* 189 (2010) 1027–1038.
- [58] S. Potez, M. Luginbühl, K. Monastyrskaya, A. Hostettler, A. Draeger, E.B. Babiychuk, Tailored protection against plasmalemmal injury by annexins with different Ca^{2+} sensitivities, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17982–17991.
- [59] A. Draeger, K. Monastyrskaya, E.B. Babiychuk, Plasma membrane repair and cellular damage control: the annexin survival kit, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 703–712.



Contents lists available at ScienceDirect

Placenta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/placenta

Review: Annexin-A5 and cell membrane repair



A. Bouter^{a,*}, R. Carmeille^a, C. Gounou^a, F. Bouvet^a, S.A. Degrelle^{b,c,d},
D. Evain-Brion^{b,c,d}, A.R. Brisson^a

^a Molecular Imaging and NanoBioTechnology, UMR-5248-CBMN CNRS-University of Bordeaux-IPB, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, F-33600 Pessac, France

^b Fondation PremUP, Paris F-75006, France

^c INSERM, U1139, Paris F-75006, France

^d Université Paris Descartes, UMR-S1139 Sorbonne Paris Cité, Paris F-75006, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 26 January 2015

Keywords:

Membrane repair

Annexin-A5

Placenta

Trophoblast

ABSTRACT

Annexins are soluble proteins that bind to biological membranes containing negatively charged phospholipids, principally phosphatidylserine, in a Ca^{2+} -dependent manner. Annexin-A5 (AnxA5), the smallest member of the annexin family, presents unique properties of membrane binding and self-assembly into ordered two-dimensional (2D) arrays on membrane surfaces. We have previously reported that AnxA5 plays a central role in the machinery of membrane repair by enabling rapid resealing of plasma membrane disruption in murine perivascular cells. AnxA5 promotes membrane repair via the formation of a protective 2D bandage at membrane damaged site. Here, we review current knowledge on cell membrane repair and present recent findings on the role of AnxA5 in membrane resealing of human trophoblasts.

© 2015 Published by IFPA and Elsevier Ltd.

1. Annexin-A5

Annexins are soluble proteins present in eukaryotes and absent in yeasts and prokaryotes [1]. Vertebrates have in common twelve annexins, named annexin A1–A13 (AnxA1–AnxA13, the number 12 being non-assigned). Annexins share the property of binding to membranes exposing negatively charged phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner [1,2]. They are formed by a four-fold repeat (eight-fold for AnxA6) of a 70 amino-acid domain, highly conserved in sequence, and by a variable amino-terminal (N_t) domain which contains phosphorylation sites and binding sites for various molecular partners and is assumed to be responsible for the functional specificity of annexins [2]. Following the determination of AnxA5 structure by X-ray crystallography [3], atomic models have been obtained for many other annexins [4]. Annexins present a common membrane-binding core formed by the cyclic arrangement of the four conserved 70 amino-acid-long domains (Fig. 1). The membrane-binding core has the shape of a slightly curved rhomboid with a convex membrane-binding face where Ca^{2+} -binding loops are exposed, and a concave face from which protrudes the N_t domain.

Membrane binding is mediated via four to eight Ca^{2+} -binding sites located on the convex face. Annexin binding presents little specificity for anionic lipid head-groups, yet the Ca^{2+} concentration required for binding varies considerably between annexins [5,6]. Most *in vitro* membrane binding studies on annexins have been performed with membrane systems containing phosphatidylserine (PS), which is the major negatively charged phospholipid in eukaryotic cell membranes [7]. Binding of annexins to membrane surfaces is very tight and depends on the content in negatively charged phospholipids and the Ca^{2+} concentration [8–10]. Equilibrium binding constants of the order of 10 fM have been measured for AnxA5 and membrane vesicles containing 25% PS at 1 mM Ca^{2+} [9].

At the functional level, annexins have been shown to participate in numerous membrane-related processes, including exo- and endo-cytosis, vesicle trafficking, regulation of blood coagulation and inflammation, membrane aggregation and fusion, or the regulation of membrane dynamics and organization [2,11]. Strikingly, although annexins do not possess a secretory signal peptide, several of them have been found both intracellularly and extracellularly. Actually, the best defined functions of annexins concern extracellular AnxA1, AnxA2 and AnxA5, which possess anti-inflammatory [12], pro-fibrinolytic [13] and anti-thrombotic [14,15] activities, respectively.

A remarkable property of several members of the annexin family –including AnxA5, AnxB12 (from hydra), AnxA4, AnxA6 and

* Corresponding author. UMR-5248-CBMN, Bat. B14, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, F-33600 Pessac, France. Tel.: +33 (0)5 40006860; fax: +33 (0)5 40002200.

E-mail address: a.bouter@cbmn.u-bordeaux.fr (A. Bouter).

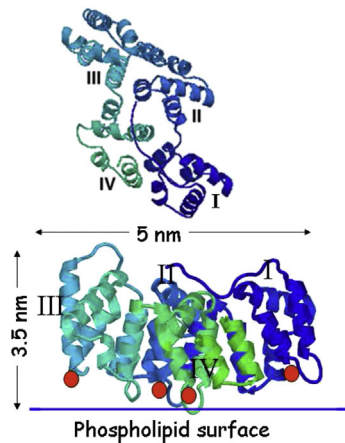


Fig. 1. Structure of soluble AnxA5. (Top) 3D structure of an AnxA5 molecule observed from the concave side, along a direction perpendicular to the membrane plane. AnxA5, the smallest annexin, presents four α -helical domains, numbered I to IV [3]. (Bottom) Side view of an AnxA5 molecule. Four Ca^{2+} ions are represented, one per α -helical domain (red dot). The approximate position of the membrane surface is indicated (blue line). These figures were created with PyMOL (<http://pymol.org>) from PDB code 1AVR.

the $(\text{AnxA2-p11})_2$ tetramer complex-is to self-organize into two dimensional (2D) arrays at the level of biological membranes [16–19]. This property has been mostly investigated in the case of AnxA5, which is the smallest annexin and consists only of the conserved membrane-binding core of annexins. Extensive studies by electron microscopy [16–19] and atomic force microscopy [10,20,21] have revealed the successive steps involved in the formation of AnxA5 2D crystals on a membrane surface (Fig. 2). When soluble AnxA5 molecules encounter a membrane containing negatively charged phospholipids in the presence of Ca^{2+} , monomeric AnxA5 molecules bind to the membrane surface, membrane-bound AnxA5 assemble rapidly into trimers [22] which self-organize into 2D ordered arrays, even at low surface density [10]. Two main types of crystals are formed by AnxA5 depending on the PS content and the Ca^{2+} concentration. At low and medium PS

content (5–20%), open hexagonal arrays with p6 symmetry form and are stable, while crystals with p3 symmetry predominate at high PS-content ($\geq 40\%$) and high Ca^{2+} concentration [10,23,24].

Given the central roles played by self-assembly processes in the construction of supra-molecular structures essential for cell's life, e.g. cell membranes, microtubules or virus capsids to name a few, the unique tendency of AnxA5 to self-assemble into 2D arrays on membranes in the presence of mM Ca^{2+} opened the hypothesis that these 2D arrays could support a cellular function. This has led ultimately to the discovery of the role of AnxA5 2D arrays in cell membrane repair, as described below.

2. Cell membrane repair

Cells from many tissues, such as skeletal or cardiac muscle, skin, gut epithelium or vascular endothelium, are exposed to mechanical stress in physiological conditions. This results often in the formation of tears in cell membrane [25]. Membrane rupture is followed by a rapid increase in the intracellular Ca^{2+} concentration, which is in the μM range in cell resting state while the extracellular Ca^{2+} concentration is in the mM range. The rise in intracellular Ca^{2+} concentration activates a repair machinery that ensures a rapid resealing and repair of membrane ruptures [26]. Failure in membrane resealing may lead to cell death and contribute to the development of degenerative diseases, such as muscular dystrophies [27]. According to current models of cell membrane repair [25,28], membrane resealing is an active process that requires extracellular Ca^{2+} , intracellular vesicles and a step of Ca^{2+} -dependent exocytosis [26]. Although small disruptions may be resealed spontaneously in synthetic liposomes, the presence of a cortical cytoskeleton in cells creates considerable membrane tension which prevents passive resealing (Fig. 3A).

Three main mechanisms of membrane repair have been proposed, which include the steps of membrane resealing and lesion removal. The classical model from McNeil and collaborators in the late 1990s proposed that the increase of intracellular Ca^{2+} concentration triggered the fusion of intracellular vesicles and the formation of a lipid patch enabling the membrane to resealed via an exocytosis-like process (Fig. 3B) [29,30]. McNeil and coworkers

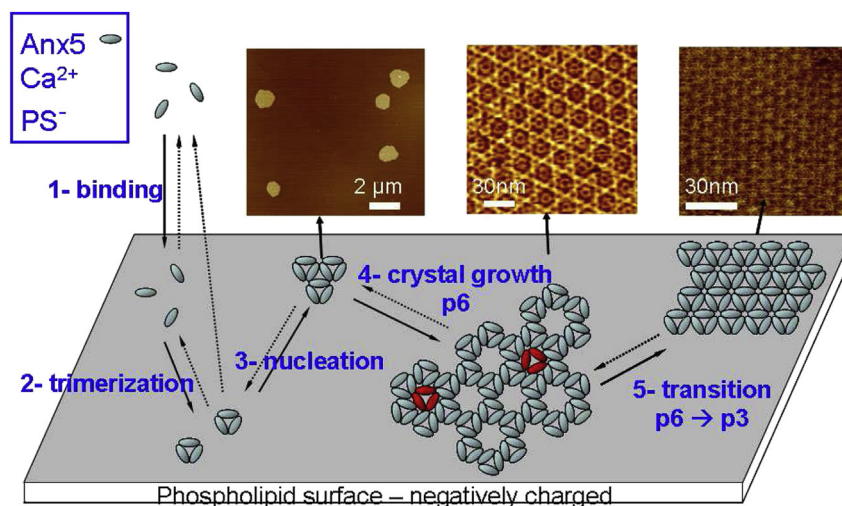


Fig. 2. 2D self-assembly of AnxA5 on a negatively charged phospholipid surface. Three successive steps take place when soluble AnxA5 molecules encounter a membrane containing negatively charged phospholipids, mainly phosphatidylserine (PS), in the presence of Ca^{2+} : 1) monomeric AnxA5 molecules bind to the membrane in a Ca^{2+} -dependent manner; 2) membrane-bound AnxA5 molecules form trimers; 3) trimers self-assemble into 2D ordered arrays, of p6 or p3 symmetry. This model is mainly based on electron microscopy and atomic force microscopy studies. The three upper panels display the nucleation, the crystal growth and the p6/p3 transition steps, as observed in atomic force microscopy.

Adapted from Ref. [10].

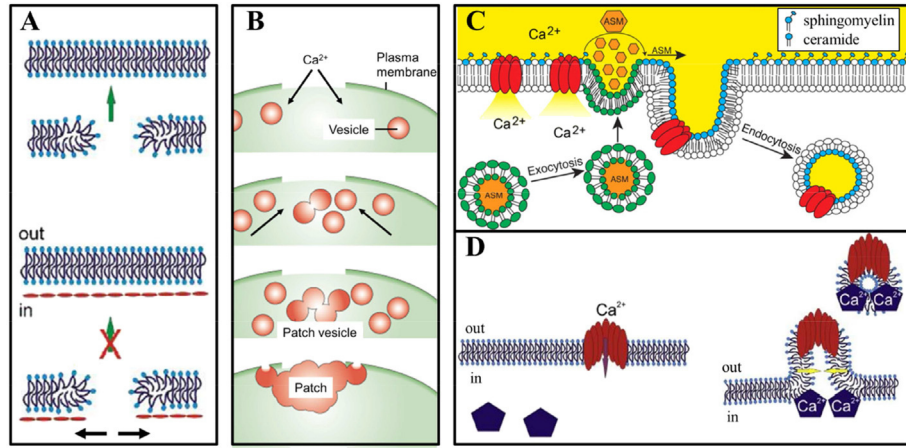


Fig. 3. Models of cell membrane repair. (A) In synthetic liposomes small disruptions is resealed spontaneously (upper panel). In contrast, considerable membrane tension due to the cortical cytoskeleton prevents passive resealing in nucleated cell (lower panel). Adapted from Ref. [40]. (B) The lipid patch hypothesis. Ca^{2+} influx triggers fusion of intracellular vesicles, which form a lipid patch. Through an exocytic-like process, the patch reseals the disrupted site. Adapted from Ref. [28]. (C) Lesion removal through ceramide-driven invagination. Bacterial toxins insert into cell plasma membranes and form pores (red) leading to the entry of Ca^{2+} which activates lysosome exocytosis and secretion of acid sphingomyelinase (ASM). The hydrolysis of sphingomyelin head groups induces ceramide-driven invagination and lesion removal via an endocytic process. Adapted from Ref. [34] (©2010 Tam et al. Journal of Cell Biology. 189:1027–1038. doi:10.1083/jcb.201003053). (D) Lesion removal by membrane shedding. Ca^{2+} influx through a toxin-induced pore activates annexins (blue diamonds) translocation to the plasma membrane. Annexins induce membrane folding which leads to the formation of an outward curvature and the release of microparticles into the extracellular milieu. Adapted from Ref. [65].

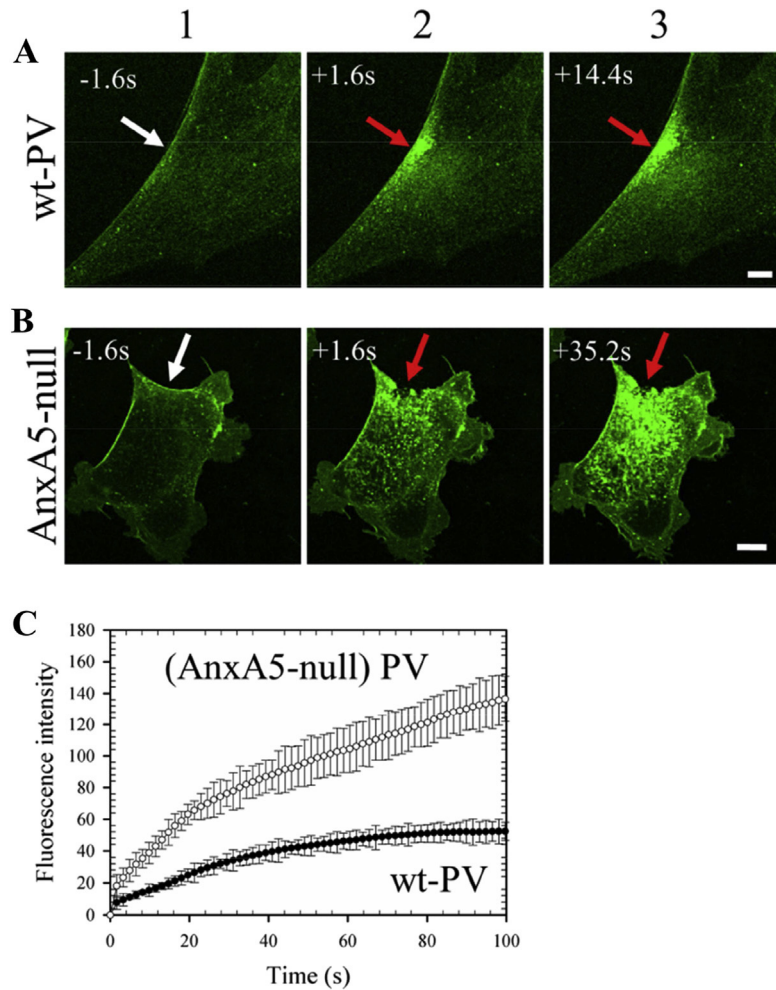


Fig. 4. AnxA5 promotes membrane repair in perivascular cells. Responses of wild-type (A) and AnxA5-null (B) murine perivascular (PV) cells after laser irradiation in the presence of 2 mM Ca^{2+} . (A) Image series showing the response of a wild-type (wt) PV cell. The cell presents an increase of cytoplasmic fluorescence intensity limited to an area closed to the wounding site. Bar = 10 μm . (B) Response of an AnxA5-null PV cell. The cell presents a macroscopic membrane rupture at the irradiated area and a large increase of cytoplasmic fluorescence intensity. Bar = 10 μm . In all frames, the area of membrane irradiation is marked with a white arrow before irradiation and a red arrow after irradiation. Image frames 1 and 2 were recorded 1.6 s before and 1.6 s after irradiation, respectively, as indicated. (C) Kinetics of FM1-43 fluorescence intensity increase for wt-PV cells (filled circles) and AnxA5-null PV cells (empty circles) after membrane damage. For wt-PV cells, the fluorescence intensity reaches a plateau after about 90 s, indicating cell membrane has resealed stopping further entrance of FM1-43 molecules. For AnxA5-null PV cells, the fluorescence intensity increases continuously, indicating the absence of membrane resealing. Adapted from Ref. [49].

hypothesized that several fusion pores formed between the edges of the patch and the plasma membrane surrounding the disruption site, similarly to the “vertex” fusion process observed when two yeast vacuoles fuse [31]. Complete connection between the patch and the plasma membrane may be created by lateral expansion of the fusion pores. While membranes of the patch, together with the residual wounded plasma membrane, are mostly released into the extracellular milieu, the lower membrane portion of the patch may restore cell membrane at the wounded site [28]. Most early investigations that led to the ‘lipid patch’ hypothesis did not use specific markers ensuring the identification of injury-induced intracellular vesicles [29,30], preventing the determination of their endo- or exo-cytic origin. Lysosomes were the first intracellular vesicles proposed to participate in membrane resealing [30]. They were thought to contribute to the lipid patch formation until the detection of lysosomal marker Lamp1 revealed a punctate distribution surrounding the disrupted site, inconsistent with the localization of lysosomes in the patch [32]. Actually, the entry of Ca^{2+} into wounded cells triggers not only lysosome exocytosis but also a form of endocytosis [33], which is induced by the secretion of lysosomal acid sphingomyelinase [34]. Exogenously-added acid sphingomyelinase enables plasma membrane repair even in the absence of Ca^{2+} [35]. Based on this, a new model has emerged according to which Ca^{2+} entry through a membrane disruption activates the exocytosis of lysosomes, which secrete acid sphingomyelinase in the extracellular milieu. Subsequently, hydrolysis of the phosphorylcholine head groups of sphingomyelin trigger ceramide-driven membrane invagination giving rise to the lesion removal by endocytosis (Fig. 3C) [33,34,36].

In addition, the processes of membrane resealing and lesion removal can also be achieved by microvesicle shedding (Fig. 3D) [37–39]. These processes may involve the ESCRT machinery [39] or neutral sphingomyelinase that triggers ceramide production in the inner leaflet of plasma membrane giving rise to an outward curvature (Fig. 3D) [40].

The implementation of one or a combination of membrane repair mechanisms depends probably on the size and the type of injury. It is noteworthy that the emerging models based on the lysosomal enzyme-induced endocytosis rely mostly on the observation of toxin-treated cells, while most studies that led to the ‘lipid patch’ hypothesis have been conducted on cells submitted to mechanical tears. Major differences are expected with regards to molecular consequences induced by these two types of injury, which may explain the various operating processes of membrane repair.

Several proteins of the membrane repair machinery have now been identified. Dysferlin has been shown to participate in the membrane fusion step of the repair process [41,42]. Mutations of the dysferlin gene are responsible for muscular dystrophies [41,43]. Several dysferlin-binding proteins have also been identified, including MG53, AHNK, calveolin-3, calpain-3, as well as several annexins [42,44,45]. In mouse primary muscle cells, AnxA1 and AnxA2 have been proposed to trigger the recruitment and fusion of intracellular vesicles during the lipid patch formation and promote its attachment to the plasma membrane, by interacting with dysferlin [42]. On the other hand, in dysferlinopathic mice that present a defect in membrane repair, it has been shown that AnxA1–AnxA2 do not interact with dysferlin. In the zebrafish skeletal muscle, membrane repair has been shown to involve the controlled and sequential assembly of a highly ordered scaffold comprising dysferlin, AnxA6, AnxA2 and AnxA1 [46]. The membrane repair machinery is therefore becoming unraveled, although the specific role of each component and their interplay remain largely to be elucidated. Unlike dysferlin, which has been found to facilitate the secretion of acid sphingomyelinase [47], most proteins of the repair

machinery were analyzed solely according to the lipid patch model. Future investigations might consider their participation in membrane repair in the light of the emerging models.

3. Discovery of the role of AnxA5 in membrane repair

In view of the 2D self-assembly properties of AnxA5, we wondered whether AnxA5 and its 2D arrays could play a role in membrane repair. This question was first addressed at the level of mouse perivascular cells, for which an AnxA5 knock-out cell line had been established [48]. We compared the responses to membrane damage of wild-type cells expressing AnxA5 and cells lacking AnxA5 [49]. A well-established procedure of membrane rupture by laser irradiation was applied, while membrane repair was assessed by measuring the entrance within the cell of FM1-43, a dye that becomes fluorescent upon inserting into intracellular membranes [41]. Wild-type cells were able to repair membrane ruptures spontaneously and rapidly. In contrast, cells lacking AnxA5 exhibited a defect in their machinery of membrane repair (Fig. 4). The addition of exogenous AnxA5 was shown to restore membrane repair ability, while an AnxA5 mutant lacking the property of 2D self-assembly failed to promote membrane resealing. This study established that AnxA5 plays a central role in the membrane repair machinery by forming a 2D bandage at the level of torn membrane edges, thus preventing the expansion of membrane wound and facilitating the final steps of membrane resealing (Fig. 5) [49].

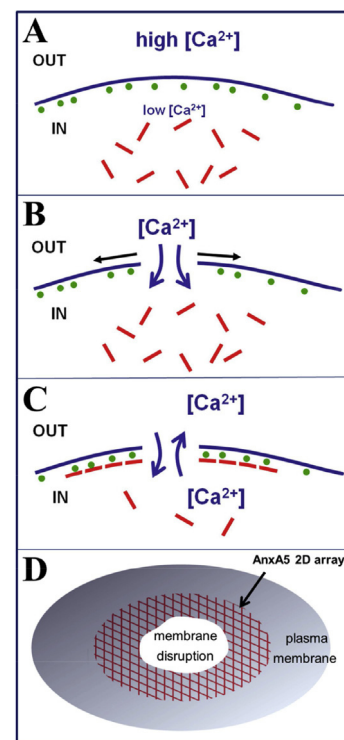


Fig. 5. Model of the function of AnxA5 in membrane repair. (A) Intact cell membrane. The extracellular and intracellular milieus differ by their high versus low Ca^{2+} concentrations, and the absence versus presence of AnxA5 (red rods) and PS (green spheres), respectively. (B) Local rupture of a cell membrane. Forces resulting from membrane tension tend to expand the tear laterally (black arrows). (C, D) The formation of AnxA5 2D arrays at the torn membrane edges stops the expansion of the wound. Upon membrane rupture, a microenvironment is formed where the intra- and extra-cellular milieus mix, providing optimal conditions for the formation of tight complexes between Ca^{2+} , PS and AnxA5. AnxA5 molecules bind to PS molecules exposed at ruptured membrane edges, form trimers and 2D arrays. These AnxA5 2D self-assemblies stabilize the membrane and stop expansion of the rupture. (D) Top view of a membrane disruption with AnxA5 2D arrays surrounding the rupture.

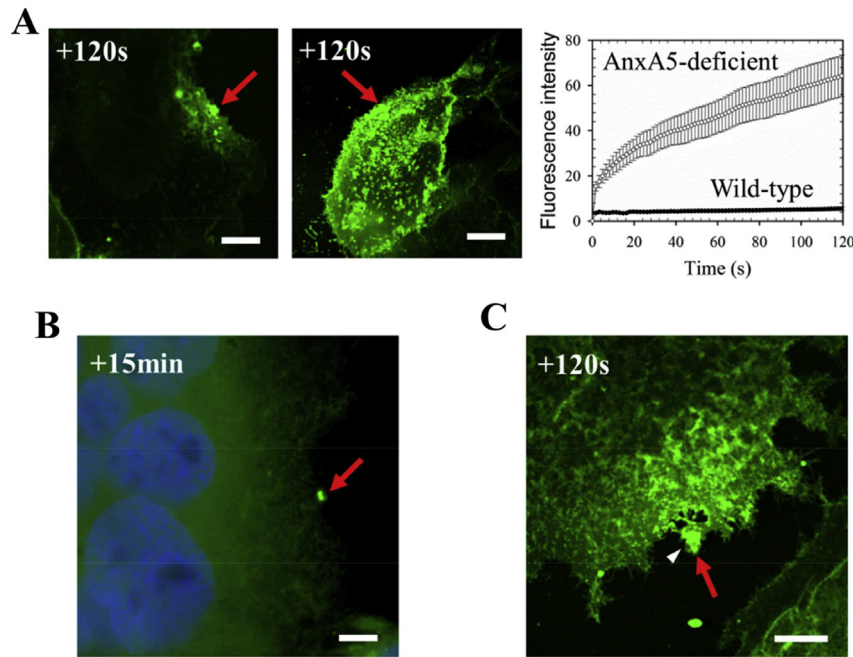


Fig. 6. AnxA5 promotes membrane resealing in human trophoblasts. (A) Representative images showing the response of a wild-type BeWo ST (left-hand panel) and an AnxA5-deficient BeWo ST (middle panel) 120 s after 110-mW infrared-laser irradiation in the presence of 1 mM Ca^{2+} . Whereas the human choriocarcinoma BeWo cell line remains as mononucleated cells in free-cAMP growth condition, cell differentiation and fusion occur in the presence of 100- μM 8-Br-cAMP for 48 h, forming large multinucleated cells (referred as BeWo ST). AnxA5-deficient BeWo ST were obtained by transduction with lentiviral particles containing AnxA5-targeting shRNA [61]. The area of membrane irradiation is marked with a red arrow (also in B, C). Bars = 20 μm (right-hand panel) For wild-type cells (filled circles) the FM1-43 fluorescence intensity reaches a plateau after about 30 s, indicating cell membrane resealing. For AnxA5-deficient cells (empty circles), the fluorescence intensity increases continuously, indicating the absence of membrane resealing. (B) Subcellular localization of endogenous AnxA5 in a damaged wild-type ST (left-hand panel) analyzed by immunocytofluorescence. Cells were irradiated, fixed with paraformaldehyde, immunostained for AnxA5 (green) and counterstained with DAPI (blue). Endogenous AnxA5 binds exclusively to the disrupted site of the injured membrane. Bar = 20 μm . (C) Lesion removal in a wild-type ST after cell membrane injury. The image was recorded 120 s after irradiation in the presence of FM1-43 (green). The white arrowhead points to the removal of a large membrane fragment containing the disrupted site. Bar = 20 μm .

4. AnxA5 promotes membrane resealing in human trophoblasts

Annexins are abundant in the placenta where they represent about 1% of total proteins [50–52]. AnxA5 was discovered in the placenta and named initially PAP-1, for placental anti-coagulant protein-1 [53].

The multinucleated syncytiotrophoblast (ST) layer covering the surface of the placenta and bathing in maternal blood is the site of numerous placental functions and plays a major role throughout pregnancy [54–56]. The ST layer expands through the continuous recruitment by fusion of underlying progenitor cytotrophoblasts (CT), and is therefore regenerated along pregnancy. The ST apical membrane that faces maternal blood is made of abundant but fragile microvilli. These microvilli are subjected to shear stresses from the maternal blood flux within the intervillous space, which result in numerous events of membrane rupture. In addition, the syncytial surface delivers into the maternal blood numerous ST-derived particles named either syncytial knots or sprouts [57]. An exacerbated deportation of trophoblast knots and sprouts into maternal blood is observed in preeclampsia, which is responsible for an inflammatory response of maternal endothelial cells directly involved in the physiopathology of preeclampsia [58,59]. The unexpected presence in ST of dysferlin, a cell membrane repair protein hitherto considered specific to skeletal muscle, suggested the existence of a plasma membrane repair machinery in the placenta [60]. The molecular mechanisms leading to the shedding of ST-derived particles and the required processes of membrane repair in the placenta are yet poorly understood.

In view of the role of AnxA5 in membrane repair and the high amount of AnxA5 in human placenta, we hypothesized that AnxA5 may also play a role in membrane repair of human trophoblasts [61]. We showed that wild-type ST reseal μm^2 -size membrane disruptions rapidly, within 30 s, whereas cells lacking AnxA5 fail to reseal membrane ruptures (Fig. 6A). Similar results were obtained for CT [61]. It is unlikely that the fast membrane resealing observed in ST is accomplished through ceramide-driven invagination induced by exocytosis of lysosomal enzymes. For instance, it was observed that secretion of significant amount of acid sphingomyelinase can take up to several minutes [34], which is inconsistent with membrane resealing occurring in the second range. Our results suggest that membrane resealing in human trophoblasts occurs via the formation of a lipid patch.

Wild-type ST express AnxA5, which is homogeneously distributed within the cell, in both the cytoplasm and the nucleus. Few seconds after membrane injury, cytosolic AnxA5—as well as extracellular AnxA5—is recruited to the disruption site, where it is retained several minutes after membrane resealing (Fig. 6B). The intracellular Ca^{2+} concentration has been found to drop rapidly after membrane resealing [37,39], at a level that is inconsistent with AnxA5 binding to PS. The presence of AnxA5 at the disrupted site several minutes after membrane resealing suggests therefore that it is trapped in a lipid environment where Ca^{2+} remains at mM concentration. Frequently, the lipid material accumulated at the disruption site of ST was found to detach from the cell, either as a large fragment (about 100- μm^2 , Fig. 6C) or as membrane debris (about 5- μm^2 [61]). Importantly, this process was observed to start after completion of membrane

resealing, which suggests that the release of lipid material corresponds to the removal of the lesion.

5. Conclusions

Cell membrane rupture creates a microenvironment where extracellular and intracellular components mix; in particular, the high intracellular concentrations of PS and AnxA5 mix with the high extracellular concentration of Ca^{2+} . Upon binding to PS molecules at the wounding site of injured cell, AnxA5 self-assembles into 2D arrays. The formation of AnxA5 2D arrays at a ruptured cell membrane strengthens the membrane [62,63] by counteracting membrane tension due to cytoskeleton attachment. AnxA5 may thus prevent the expansion of the tear and facilitate membrane resealing. By participating in the earliest step of membrane repair, according to a process based only on the Ca^{2+} influx and the presence of PS at the plasma membrane, AnxA5 functions likely in a universal and ubiquitous way whatever the subsequent membrane resealing and lesion removal mechanisms.

The human trophoblast, which is the primary barrier separating maternal blood from fetal blood, is a fragile tissue. Various types of damages may affect the ST plasma membrane and result in the exposure of PS-containing membranes to maternal blood. In view of the pro-coagulant properties of PS-exposing membranes, efficient mechanisms of membrane repair must operate in the placenta to prevent onset of blood coagulation, which could be life-threatening for the fetus.

Extracellular—as well as cytosolic—AnxA5 binds to the disrupted site of injured plasma membrane as early as few seconds after membrane wounding and promotes membrane resealing. Rand and collaborators have proposed that extracellular AnxA5 forms a 2D anti-thrombotic shield covering the surface of placental ST in physiological conditions [64]. They proposed also that this protective shield was disrupted by anti-phospholipid antibodies and that the correlated exposure of pro-coagulant phospholipids was responsible for recurrent pregnancy losses observed in patients presenting the anti-phospholipid antibody syndrome [14,64]. It would be relevant to revisit this interesting hypothesis in the context of membrane repair.

The presence of many annexins in the placenta [50–52], together with the participation of several members of the annexin family in membrane repair processes, raise the question of a collective role of these proteins in the protection and repair of membrane injuries in trophoblasts.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by ANR (grant 11-BSV1-03501-Placenta5 to A.R.B.) and by AFM-Téléthon (grant AFM-téléthon-17140 to A.B.).

References

- [1] Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biol* 2004;5:219.
- [2] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:449–61.
- [3] Huber R, Römisch J, Paques EP. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* 1990;9:3867–74.
- [4] Swairjo MA, Seaton BA. Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1994;23:193–213.
- [5] Blackwood RA, Ernst JD. Characterization of Ca^{2+} -dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem J* 1990;266:195–200.
- [6] Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 1990;265:4923–8.
- [7] Devaux PF. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992;21:417–39.
- [8] Lu Y, Bazzi MD, Nelsestuen GL. Kinetics of annexin VI, calcium, and phospholipid association and dissociation. *Biochemistry* 1995;34:10777–85.
- [9] Tait JF, Gibson DF, Smith C. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Anal Biochem* 2004;329:112–9.
- [10] Richter RP, Him JLK, Tessier B, Tessier C, Brisson AR. On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. *Biophys J* 2005;89:3372–85.
- [11] Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1197:63–93.
- [12] D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol* 2008;155:152–69.
- [13] Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, et al. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2004;113:38–48.
- [14] Rand JH, Wu X-X. Antibody-mediated interference with annexins in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2004;114:383–9.
- [15] Ueki H, Mizushima T, Laoharatchatathanan T, Terashima R, Nishimura Y, Rianrakwong D, et al. Loss of maternal annexin A5 increases the likelihood of placental platelet thrombosis and foetal loss. *Sci Rep* 2012;2:827.
- [16] Mosser G, Ravanat C, Freyssinet JM, Brisson A. Sub-domain structure of lipid-bound annexin-V resolved by electron image analysis. *J Mol Biol* 1991;217:241–5.
- [17] Voges D, Berendes R, Burger A, Demange P, Baumeister W, Huber R. Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. A correlative electron microscopy–X-ray crystallography study. *J Mol Biol* 1994;238:199–213.
- [18] Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *J Struct Biol* 2001;133:55–63.
- [19] Govorukhina N, Bergsma-Schutter W, Mazères-Dubut C, Mazères S, Drakopoulou E, Bystrykh L, et al. Self-assembly of annexin A5 on lipid membranes. *Landes Biosciences, Kluwer Academic/Plenum Publishers*; n.d. p. 61–78.
- [20] Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Growth of protein 2-D crystals on supported planar lipid bilayers imaged in situ by AFM. *J Struct Biol* 1998;121:356–61.
- [21] Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Mazères-Dubut C, Govorukhina N, Brisson A. Surface topography of the p3 and p6 annexin V crystal forms determined by atomic force microscopy. *J Struct Biol* 2000;131:234–9.
- [22] Langen R, Isas JM, Luecke H, Haigler HT, Hubbell WL. Membrane-mediated assembly of annexins studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem* 1998;273:22453–7.
- [23] Brisson A, Bergsma-Schutter W, Oling F, Lambert O, Reviakine I. Two-dimensional crystallization of proteins on lipid monolayers at the air–water interface and transfer to an electron microscopy grid. *J Cryst Growth* 1999;196:456–70.
- [24] Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Morozov AN, Brisson A. Two-dimensional crystallization of annexin a5 on phospholipid bilayers and monolayers: a solid–solid phase transition between crystal forms. *Langmuir* 2001;17:1680–6.
- [25] McNeil PL, Steinhardt RA. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:697–731.
- [26] Steinhardt RA, Bi G, Alderton JM. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* 1994;263:390–3.
- [27] Glover L, Brown RH. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic* 2007;8:785–94.
- [28] McNeil PL, Kirchhausen T. An emergency response team for membrane repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:499–505.
- [29] Miyake K, McNeil PL. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *J Cell Biol* 1995;131:1737–45.
- [30] McNeil PL, Vogel SS, Miyake K, Terasaki M. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 11):1891–902.
- [31] Wang X, Campos B, Kaetzel MA, Dedman JR. Secretion of annexin V from cultured cells requires a signal peptide. *Placenta* 2001;22:837–45. <http://dx.doi.org/10.1053/plac.2001.0724>.
- [32] Reddy A, Caler EV, Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 2001;106:157–69.
- [33] Idone V, Tam C, Goss JW, Toomre D, Pypaert M, Andrews NW. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca^{2+} -dependent endocytosis. *J Cell Biol* 2008;180:905–14.
- [34] Tam C, Idone V, Devlin C, Fernandes MC, Flannery A, He X, et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J Cell Biol* 2010;189:1027–38.
- [35] Tam C, Flannery AR, Andrews N. Live imaging assay for assessing the roles of Ca^{2+} and sphingomyelinase in the repair of pore-forming toxin wounds. *J Vis Exp* 2013:e50531.
- [36] Andrews NW, Almeida PE, Corrotte M. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends Cell Biol* 2014;24:734–42.

- [37] Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger A. Intracellular Ca(2+) operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death Differ* 2009;16:1126–34.
- [38] Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger A. Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death Differ* 2011;18:80–9.
- [39] Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* 2014;343:1247136.
- [40] Draeger A, Monastyrskaya K, Babiychuk EB. Plasma membrane repair and cellular damage control: the annexin survival kit. *Biochem Pharmacol* 2011;81:703–12.
- [41] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen C-C, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003;423:168–72.
- [42] Lennon NJ, Kho A, Bacskaï BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 2003;278:50466–73.
- [43] Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20:31–6.
- [44] McNeil AK, Rescher U, Gerke V, McNeil PL. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J Biol Chem* 2006;281:35202–7.
- [45] Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, Hwang M, et al. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol* 2009;11:56–64.
- [46] Roostalu U, Strähle U. In vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma. *Dev Cell* 2012;22:515–29.
- [47] Defour A, Van der Meulen JH, Bhat R, Bigot A, Bashir R, Nagaraju K, et al. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. *Cell Death Dis* 2014;5:e1306.
- [48] Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, von der Mark K, Hofmann C, et al. Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* 2003;23:2907–13.
- [49] Bouter A, Gounou C, Bérat R, Tan S, Gallois B, Granier T, et al. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun* 2011;2:270.
- [50] Tait JF, Sakata M, McMullen BA, Miao CH, Funakoshi T, Hendrickson LE, et al. Placental anticoagulant proteins: isolation and comparative characterization four members of the lipocortin family. *Biochemistry* 1988;27:6268–76.
- [51] Römisch J, Heimburger N. Purification and characterization of six annexins from human placenta. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990;371:383–8.
- [52] Buhl WJ, García MT, Zipfel M, Schiebler W, Gehring U. A series of annexins from human placenta and their characterization by use of an endogenous phospholipase A2. *Eur J Cell Biol* 1991;56:381–90.
- [53] Funakoshi T, Heimark RL, Hendrickson LE, McMullen BA, Fujikawa K. Human placental anticoagulant protein: isolation and characterization. *Biochemistry* 1987;26:5572–8.
- [54] Hay WW. Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm Res* 1994;42:215–22.
- [55] Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. Springer Science & Business Media; 2000.
- [56] Evain-Brion D, Malassine A. Human placenta as an endocrine organ. *Growth Horm IGF Res* 2003;13(Suppl. A):S34–7.
- [57] Burton GJ, Jones CJP. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009;48:28–37.
- [58] Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:632–40.
- [59] Johansen M, Redman CW, Wilkins T, Sargent IL. Trophoblast deportation in human pregnancy – its relevance for pre-eclampsia. *Placenta* 1999;20:531–9.
- [60] Vandré DD, Ackerman WE, Kniss DA, Tewari AK, Mori M, Takizawa T, et al. Dysferlin is expressed in human placenta but does not associate with caveolin. *Biol Reprod* 2007;77:533–42.
- [61] Carmelle R, Degrelle S, Plawinski L, Bouvet F, Gounou C, Evain-Brion D, et al. Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts. *Biochim Biophys Acta* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.038>.
- [62] V nien-Bryan C, Lenne PF, Zakri C, Renault A, Brisson A, Legrand JF, et al. Characterization of the growth of 2D protein crystals on a lipid monolayer by ellipsometry and rigidity measurements coupled to electron microscopy. *Biophys J* 1998;74:2649–57.
- [63] Saurel O, C zanne L, Milon A, Tocanne JF, Demange P. Influence of annexin V on the structure and dynamics of phosphatidylcholine/phosphatidylserine bilayers: a fluorescence and NMR study. *Biochemistry* 1998;37:1403–10.
- [64] Krikun G, Lockwood CJ, Wu XX, Zhou XD, Guller S, Calandri C, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation. *Placenta* 1994;15:601–12.
- [65] Draeger A, Schoenauer R, Atanassoff AP, Wolfmeier H, Babiychuk EB. Dealing with damage: plasma membrane repair mechanisms. *Biochimie* 2014;107(Pt A):66–72.

Discussion générale

Discussion générale

Au démarrage de ce projet de thèse, le laboratoire souhaitait répondre à trois questions majeures :

- 4) Le rôle joué par l'AnxA5 dans la réparation membranaire, mis en évidence pour les cellules périvasculaires murines, s'étend-il à d'autres systèmes cellulaires ?
- 5) Quel est le mode d'action de l'AnxA5 dans la réparation membranaire ?
- 6) Quel(s) est (sont) le(s) mécanisme(s) de réparation membranaire des fibres musculaires et des trophoblastes humains ?

Si des zones d'ombre persistent, ce travail a permis d'apporter un certain nombre de réponses à ces questions.

1) Le rôle joué par l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire, mis en évidence au niveau des cellules périvasculaires murines, s'étend-il à d'autres systèmes cellulaires ?

La mise en évidence du rôle joué par l'AnxA5 dans le processus de réparation membranaire des péricytes murins, constituait une découverte tout à fait originale (Bouter et al. 2011). Aucune étude n'avait attribué cette fonction à l'AnxA5 jusque-là. Afin de déterminer si l'AnxA5 pouvait jouer un rôle similaire dans d'autres cellules, nous nous sommes intéressés aux trophoblastes humains, car le placenta est l'un des organes les plus riches en AnxA5 (Funakoshi et al. 1987). Les trophoblastes ont, de plus, été montré comme exprimant la dysferline, un acteur majeur de la réparation membranaire (Vandré et al. 2007). Notre choix s'est également porté vers le tissu musculaire strié squelettique humain pour des raisons physiopathologiques évidentes. Une défaillance du processus de réparation membranaire conduit au développement de certaines dystrophies musculaires, telles que la LGMB2B et la LGMD1C. L'existence de lignées cellulaires établies à partir de patients souffrant de LGMD2B ou de LGMD1C a également orienté ce choix. Elles constituent effectivement un outil cellulaire important pour la réalisation de cette étude.

Pour faire partie de la machinerie protéique de réparation membranaire de façon ubiquitaire, l'AnxA5 doit être présente en quantité suffisante dans les cellules soumises à des contraintes mécaniques importantes. Elle a été décrite comme étant une protéine abondante dans les péricytes murins, les trophoblastes placentaires et les fibroblastes humains, dans lesquels elle peut représenter jusqu'à 1% de la masse protéique totale (Bouter et al. 2011) (Schlaepfer et Haigler 1987; Jennifer L. Barwise et Walker 1996; Rambotti, Spreca, et Donato 1993). Nos résultats permettent de valider la présence d'AnxA5 en forte quantité dans les trophoblastes humains. L'AnxA5 représente environ 0.35% de la masse protéique totale dans les CT et ST de la lignée BeWo et 1% dans des CT et ST primaires (Carmeille et al. 2015) . Nos résultats montrent, de plus, que l'AnxA5 représente 1% de la masse protéique totale dans les cellules musculaires striées squelettiques humaines. Ces données suggèrent que l'AnxA5 est une protéine ubiquitaire et présente de façon abondante dans de nombreux tissus.

Pour pouvoir participer à la réparation de la membrane plasmique, l'AnxA5 doit être disponible dans la cellule. Que ce soit pour les fibroblastes (Jennifer L. Barwise et Walker

1996), les cellules trophoblastiques primaires, les trophoblastes de la lignée Bewo (Carmeille et al. 2015) ou les myoblastes et myotubes LHCN-M2, un pool important d'AnxA5 est présent dans le cytoplasme. La distribution homogène que nous avons observée dans l'ensemble des cellules analysées, suggère qu'elle se localise principalement dans le cytosol. L'AnxA5 est ainsi libre de diffuser vers le site de rupture en cas de dommage membranaire. De façon intéressante, nous avons observé que l'AnxA5 co-localise avec des filaments d'actine dans la région péri-nucléaire des myotubes LHCN-M2. Actuellement, nous n'avons aucune explication sur la signification biologique d'une interaction potentielle entre l'AnxA5 et les microfilaments. Une action coordonnée de ces deux acteurs essentiels de la machinerie protéique de réparation pourrait être postulée. Nous n'avons non plus aucune explication sur la localisation nucléaire de l'AnxA5 dans la majorité des cellules étudiées, à l'exception des myotubes.

Les trophoblastes et les myotubes humains, rendus déficients en AnxA5, sont incapables de réparer des lésions mécaniques de leur membrane plasmique. Pour les myotubes, l'ajout d'AnxA5 recombinante permet de restaurer la capacité de réparation de ces cellules déficientes en AnxA5. Ceci n'est pas permis avec l'AnxA5 mutante qui ne possède pas la propriété de former des réseaux-2D à la surface des membranes. Ces résultats permettent de conclure que l'AnxA5 est un composant indispensable à la machinerie de réparation dans ces deux types cellulaires.

2) Quel est le mode d'action de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire ?

Il est nécessaire à ce stade de distinguer les dommages mécaniques de la membrane plasmique des dommages créés par l'insertion de PFTs. L'AnxA5 ne semble effectivement pas avoir un mode d'action commun pour ces deux types de dommage.

2.a) Cas de dommages mécaniques

Dans les péricytes murins, il a été proposé que l'AnxA5 se lie aux PS accessibles au niveau de la zone endommagée de la membrane plasmique, où elle s'auto-assemble pour former un réseau-2D. Ce réseau-2D s'opposerait aux forces de tension exercées par le cytosquelette, et rigidifierait localement la membrane lésée afin d'éviter une extension de la déchirure. La limitation de l'expansion de la rupture et la formation d'une plateforme stable, autour de la région membranaire lésée, serait essentielle pour la mise en place des processus de réparation.

Dans les trophoblastes et cellules musculaires striées squelettiques, l'AnxA5 s'accumule en quelques secondes au site de rupture. Dans les myotubes LHCN-M2 endommagés, nous avons mis en évidence, par imagerie en microscopie électronique à transmission, la présence d'AnxA5 endogène en interaction avec la membrane plasmique, aux bords de la zone de rupture. Ces observations vont dans le sens du modèle proposé pour les péricytes murins. Le recrutement d'AnxA5 au site de rupture se réalise également dans les lignées 650 et 578,

indiquant que ce recrutement n'est pas dépendant de la présence de la cavéoline-3 et de la dysferline.

Dans les deux types cellulaires étudiés, l'AnxA5 reste localisée au site de rupture bien au-delà de la période nécessaire pour la réparation membranaire, suggérant qu'elle est piégée dans un environnement lipidique où la concentration reste à une valeur proche du mM. L'imagerie par microscopie électronique à transmission a permis de mettre en évidence que de l'AnxA5 est également présente dans la lumière de la zone endommagée. L'AnxA5 est alors liée à la surface de vésicules lipidiques. Elle reste ainsi exposée à une concentration en Ca^{2+} de l'ordre du mM.

Nous avons observé que l'ajout d'AnxA5 recombinante, mais pas d'une AnxA5 mutée, permet de restaurer la capacité de réparation membranaire des myotubes déficients en AnxA5. Ce résultat confirme que la formation de réseaux-2D est cruciale dans le mode d'action de l'AnxA5 pour la réparation membranaire.

Pour les trophoblastes, comme pour les myotubes, l'AnxA5 extracellulaire est capable de se lier en quelques secondes au site de rupture. Plusieurs études ont rapporté l'existence d'AnxA5 extracellulaire en condition physiologique (Flaherty et al. 1990; Tait et al. 1988). Présente dans le milieu extracellulaire, l'AnxA5 pourrait participer à la réparation membranaire dans de nombreux types cellulaires. Toutefois, la présence d'AnxA5 extracellulaire demeure le sujet de débat.

L'ensemble des observations faites lors de ce travail valide le mécanisme proposé pour les péricytes murins. La présence d'AnxA5 à la surface des vésicules lipidiques, présentes dans la lumière du dommage membranaire, est un élément nouveau à ajouter à ce modèle. Nous n'avons pour le moment aucune hypothèse à formuler sur le rôle joué par ce pool d'AnxA5.

2.b) Cas de dommages créés par des PFTs

Les myotubes rendus déficients en AnxA5, par une stratégie d'interférence par ARN, conservent la capacité de restaurer leur sarcolemme endommagé par des PFTs. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Il est tout d'abord possible que l'AnxA5 n'ait aucun rôle dans la réparation de ce type de dommage. Les myotubes de la lignée 650 sont également capables de restaurer leur sarcolemme endommagées par les PFTs, suggérant que la cavéoline-3 ne participe pas au processus de réparation de ce type de dommage. Il est donc possible qu'un mécanisme de réparation spécifique se mette en place, sans implication de l'AnxA5 ni de la cavoline-3. Le recrutement de l'AnxA5 au sarcolemme endommagé par les PFTs, ne correspondrait alors qu'à une conséquence collatérale de l'élévation locale de la concentration en Ca^{2+} .

Une autre hypothèse, d'ordre expérimental, est également envisageable. Les taux résiduels d'AnxA5 dans les myotubes transduits pourraient être suffisants pour l'élimination des pores

nucléaires. La perforation par la SLO conduit, en effet, à des ouvertures membranaires de petite taille et donc à des flux calciques entrants modérés. Elle requiert probablement l'intervention de moins d'AnxA5 endogène, comparée à la rupture mécanique. Des stratégies plus efficaces d'extinction de l'expression de l'AnxA5 sont à envisager pour éclaircir ce point. Il est enfin possible que la déficience en AnxA5 soit compensée par la présence d'autres Anx. En effet, il a été montré que l'AnxA6 et l'AnxA1 assurent de manière complémentaire l'élimination des régions membranaires endommagées par la SLO (Potez et al. 2011). L'AnxA6 et l'AnxA1 pourraient ainsi compenser l'absence d'AnxA5.

3) Quel(s) est (sont) le(s) mécanisme(s) de réparation membranaire des fibres musculaires et des trophoblastes humains ?

Plusieurs mécanismes de réparation membranaire ont été proposés à ce jour. Nous pouvons les résumer en trois grands principes : 1) colmatage de la rupture par du matériel membranaire d'origine cytoplasmique, 2) bourgeonnement de la région membranaire contenant le site lésé et élimination dans le milieu extracellulaire sous forme de microparticule et 3) endocytose de la région membranaire contenant le site lésé et formation de corps multivésiculaires permettant la dégradation de cette région.

Il est également nécessaire à ce stade de distinguer les dommages mécaniques de la membrane plasmique des dommages créés par l'insertion de PFTs.

3.a) Cas des dommages mécaniques

Cette étude montre que, pour une rupture mécanique d'environ $1\mu\text{m}^2$, les ST, les myotubes LHCN-M2 et les CT sont capables de réparer la membrane en 30s, 70s et 100s, respectivement. Les myoblastes sont en revanche incapables de réparer une lésion macroscopique du sarcolemme. L'absence de protéines impliquées dans la machinerie de réparation, telles que la cavéoline-3 et MG53 (Cai, Masumiya, Weisleder, Pan, et al. 2009a), est la cause la plus probable de cette déficience. La dysferline est exprimée de façon similaire dans les myoblastes et myotubes LHCN-M2.

Les ruptures mécaniques du sarcolemme des myotubes LHCN-M2, par irradiation laser, n'ont jamais conduit à l'observation de bourgeonnements membranaires. Nous avons en revanche observé, par microscopie électronique à transmission, la présence de vésicules lipidiques, agrégées les unes avec les autres, au niveau du site de rupture. Même si l'origine de ces vésicules n'a pas été déterminée, leur présence suggère fortement un mécanisme de colmatage par formation d'un « patch » lipidique. De futures expériences par imagerie en microscopie électronique à transmission, en utilisant des marqueurs vésiculaires variés, devraient permettre de renseigner sur la nature de ces vésicules. Le processus d'élimination de cet

agrégat lipidique au niveau du site de rupture demeure inconnu. Nous ne savons donc pas à l'heure actuelle comment le sarcolemme retrouve sa structure originelle.

Dans les ST endommagés, une grande quantité de matériel lipidique s'accumule au site de rupture quelques secondes après le dommage membranaire. Même si la nature de ce matériel lipidique n'a pas été déterminée, les variations de fluorescence associées au FM1-43 suggèrent une origine cytoplasmique. Il est peu probable que le processus très rapide de réparation observé dans les ST puisse reposer sur un mécanisme d'endocytose induit par sécrétion de sphingomyélinases. En effet, il a été observé que la sécrétion de quantité significative de sphingomyélinases requiert plusieurs minutes (Tam et al. 2010). Le mécanisme le plus probable pour la réparation membranaire dans les ST est donc une nouvelle fois le « patch » lipidique.

Concernant l'élimination de la région membranaire lésée et la restauration de la membrane plasmique, nous avons observé, après réparation, le rejet dans le milieu extracellulaire de la région membranaire contenant le site de rupture. Ce rejet se réalise soit par l'élimination en une étape de l'ensemble de la région contenant l'agrégat lipidique et le site endommagé, soit par le rejet successif de débris membranaires à partir de la région endommagée. Un processus très similaire a depuis été observé dans les cellules MCF-7 endommagées de façon mécanique (Jaiswal et al. 2014).

3.b) Cas des dommages créés par des PFTs

Dans les myotubes LHCN-M2 exposés à la SLO, nous avons observé la formation de protrusions membranaires de forme tubulaire. L'accumulation d'AnxA5 au niveau de ces protrusions suggère une concentration en Ca^{2+} localement élevée, induite probablement par la présence des pores membranaires. Nous pouvons donc postuler que l'élimination des régions membranaires endommagées se réalise via un mécanisme de bourgeonnements. Aucune observation ne permet de conclure sur le devenir de ces protrusions. Nous n'avons par exemple jamais observé leur rejet dans le milieu extracellulaire.

Comme indiqué précédemment, avec toutes les réserves susmentionnées, le mécanisme de réparation semble indépendant de la présence d'AnxA5 et de cavéoline-3. La machinerie protéique de réparation pourrait donc être spécifique à ce type de dommage. De futures expériences sont requises pour affiner nos connaissances dans ce domaine.

4) Perspectives

L'AnxA5 est un des membres d'une famille de 12 protéines. Il est aujourd'hui établi que plusieurs membres sont impliqués dans la réparation membranaire, telles que l'AnxA1, l'AnxA2, l'AnxA6 et l'AnxA7. Les études ayant conduit à ces découvertes reposent sur des

Discussion générale

modèles cellulaires différents, d'espèces différentes. Fort des travaux réalisés sur l'AnxA5, le laboratoire souhaite entamer des études sur le rôle des Anx dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines.

Pour les trophoblastes humains, une des questions majeures à laquelle le laboratoire souhaiterait apporter une réponse, concerne la relation potentielle entre une défaillance du processus de réparation membranaire au niveau placentaire et la pré-éclampsie. Il a en effet été observé que les cas sévères de pré-éclampsie sont associés à une chute de l'expression de la dysferline trophoblastique. Des cellules « pré-éclamptiques » modèles sont en cours d'obtention.

Enfin, afin de confirmer l'hypothèse du rôle général de l'AnxA5 dans la réparation membranaire, des projets sur d'autres types cellulaires vont voir le jour. Le laboratoire s'intéresse notamment aux rôles joués par les Anx dans la réparation membranaire des cellules métastatiques.

Bibliographie

Bibliographie

- Abdullah, Nazish, Muruges Padmanarayana, Naomi J. Marty, et Colin P. Johnson. 2014. « Quantitation of the Calcium and Membrane Binding Properties of the C2 Domains of Dysferlin ». *Biophysical Journal* 106 (2): 382-389. doi:10.1016/j.bpj.2013.11.4492.
- Abreu-Blanco, Maria Teresa, Jeffrey M. Verboon, et Susan M. Parkhurst. 2011. « Cell wound repair in *Drosophila* occurs through three distinct phases of membrane and cytoskeletal remodeling ». *The Journal of Cell Biology* 193 (3): 455-464. doi:10.1083/jcb.201011018.
- Abumaree, M. H., P. R. Stone, et L. W. Chamley. 2006. « An in Vitro Model of Human Placental Trophoblast Deportation/shedding ». *Molecular Human Reproduction* 12 (11): 687-694. doi:10.1093/molehr/gal073.
- « Actin, Myosin, and Cell Movement - The Cell - NCBI Bookshelf ». 2015. Consulté le septembre 16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9961/>.
- Adu-Gyamfi, Emmanuel, Kristen A. Johnson, Mark E. Fraser, Jordan L. Scott, Smita P. Soni, Keaton R. Jones, Michelle A. Digman, Enrico Gratton, Charles R. Tessier, et Robert V. Stahelin. 2015. « Host Cell Plasma Membrane Phosphatidylserine Regulates the Assembly and Budding of Ebola Virus ». *Journal of Virology* 89 (18): 9440-9453. doi:10.1128/JVI.01087-15.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, et Peter Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th éd. Garland Science.
- Alias, Laura, Pía Gallano, Dolores Moreno, Ramón Pujol, Juan Antonio Martínez-Matos, Montserrat Baiget, Isidro Ferrer, et Montse Olivé. 2004. « A Novel Mutation in the Caveolin-3 Gene Causing Familial Isolated hyperCKaemia ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 14 (5): 321-324. doi:10.1016/j.nmd.2004.01.006.
- Alonso Y Adell, Manuel, et David Teis. 2011. « Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex ». *Febs Letters* 585 (20): 3191-3196. doi:10.1016/j.febslet.2011.09.001.
- Alouf, J. E. 2001. « Pore-Forming Bacterial Protein Toxins: An Overview ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 257: 1-14.
- Anderson, Louise V. B., Keith Davison, Jennifer A. Moss, Carol Young, Michael J. Cullen, John Walsh, Margaret A. Johnson, et al. 1999. « Dysferlin Is a Plasma Membrane Protein and Is Expressed Early in Human Development ». *Human Molecular Genetics* 8 (5): 855-861. doi:10.1093/hmg/8.5.855.
- Andree, H. A., M. C. Stuart, W. T. Hermens, C. P. Reutelingsperger, H. C. Hemker, P. M. Frederik, et G. M. Willems. 1992. « Clustering of Lipid-Bound Annexin V May Explain Its Anticoagulant Effect. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (25): 17907-17912.
- Andrews, Norma W., Patricia E. Almeida, et Matthias Corrotte. 2014. « Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair ». *Trends in Cell Biology*. Consulté le août 27. doi:10.1016/j.tcb.2014.07.008.
- Arantes, Rosa M. E., et Norma W. Andrews. 2006. « A Role for Synaptotagmin VII-Regulated Exocytosis of Lysosomes in Neurite Outgrowth from Primary Sympathetic Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 26 (17): 4630-4637. doi:10.1523/JNEUROSCI.0009-06.2006.
- Arboledas, David, Nieves Olmo, M^a Antonia Lizarbe, et Javier Turnay. 1997. « Role of the N-terminus in the structure and stability of chicken annexin V ». *FEBS Letters* 416 (2): 217-220. doi:10.1016/S0014-5793(97)01207-6.
- Ardissone, Anna, Cinzia Bragato, Lorella Caffi, Flavia Blasevich, Sabrina Maestrini, Maria Luisa Bianchi, Lucia Morandi, Isabella Moroni, et Marina Mora. 2013. « Novel PTRF Mutation in a Child with Mild Myopathy and Very Mild Congenital Lipodystrophy ». *BMC Medical Genetics* 14: 89. doi:10.1186/1471-2350-14-89.
- Arnoys, Eric J., et John L. Wang. 2007. « Dual Localization: Proteins in Extracellular and Intracellular Compartments ». *Acta Histochemica* 109 (2): 89-110. doi:10.1016/j.acthis.2006.10.002.
- Arumugam, Thiruma V., Ian A. Shiels, Trent M. Woodruff, Robert C. Reid, David P. Fairlie, et Stephen M. Taylor. 2002. « Protective Effect of a New C5a Receptor Antagonist against Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Small Intestine ». *Journal of Surgical Research* 103 (2): 260-267. doi:10.1006/jsre.2002.6369.

Bibliographie

- Avila-Sakar, Agustin J, Carl E Creutz, et Robert H Kretsinger. 1998. « Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state1 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1387 (1–2): 103–116. doi:10.1016/S0167-4838(98)00111-3.
- Babiychuk, E. B., K. Monastyrskaya, S. Potez, et A. Draeger. 2009. « Intracellular Ca²⁺ Operates a Switch between Repair and Lysis of Streptolysin O-Perforated Cells ». *Cell Death & Differentiation* 16 (8): 1126–1134. doi:10.1038/cdd.2009.30.
- Babiychuk, E B, K Monastyrskaya, S Potez, et A Draeger. 2011. « Blebbing confers resistance against cell lysis ». *Cell Death and Differentiation* 18 (1): 80–89. doi:10.1038/cdd.2010.81.
- Babiychuk, Eduard B., Alexander P. Atanassoff, Katia Monastyrskaya, Christina Brandenberger, Daniel Studer, Catherine Allemann, et Annette Draeger. 2011. « The Targeting of Plasmalemmal Ceramide to Mitochondria during Apoptosis ». *PLoS ONE* 6 (8). doi:10.1371/journal.pone.0023706.
- Babiychuk, Eduard B., Katia Monastyrskaya, et Annette Draeger. 2008. « Fluorescent Annexin A1 Reveals Dynamics of Ceramide Platforms in Living Cells ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9 (10): 1757–1775. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00800.x.
- Bae, Jong Seok, Chang-Seok Ki, Jong-Won Kim, Yeon-Lim Suh, Min Soo Park, Byung Joon Kim, et Sung-Jae Kim. 2007. « A Novel in-Frame Deletion in the CAV3 Gene in a Korean Patient with Rippling Muscle Disease ». *Journal of the Neurological Sciences* 260 (1-2): 275–278. doi:10.1016/j.jns.2007.04.023.
- Bandorowicz-Pikula, Joanna. 2003. *Annexins: Biological Importance and Annexin-Related Pathologies*. Springer Science & Business Media.
- Bansal, Dimple, Katsuya Miyake, Steven S. Vogel, Séverine Groh, Chien-Chang Chen, Roger Williamson, Paul L. McNeil, et Kevin P. Campbell. 2003. « Defective Membrane Repair in Dysferlin-Deficient Muscular Dystrophy ». *Nature* 423 (6936): 168–172. doi:10.1038/nature01573.
- Barber, Robert D., Dan W. Harmer, Robert A. Coleman, et Brian J. Clark. 2005. « GAPDH as a Housekeeping Gene: Analysis of GAPDH mRNA Expression in a Panel of 72 Human Tissues ». *Physiological Genomics* 21 (3): 389–395. doi:10.1152/physiolgenomics.00025.2005.
- Bartsch, John E., Edgar D. Staren, et Hubert E. Appert. 2003. « Adhesion and Migration of Extracellular Matrix-Stimulated Breast Cancer ». *The Journal of Surgical Research* 110 (1): 287–294.
- Barwise, Jennifer L., et John H. Walker. 1996. « Subcellular localization of annexin V in human foreskin fibroblasts: nuclear localization depends on growth state ». *FEBS Letters* 394 (2): 213–216. doi:10.1016/0014-5793(96)00950-7.
- Barwise, J. L., et J. H. Walker. 1996. « Annexins II, IV, V and VI Relocate in Response to Rises in Intracellular Calcium in Human Foreskin Fibroblasts ». *Journal of Cell Science* 109 (Pt 1) (janvier): 247–255.
- Bashir, R., T. Strachan, S. Keers, A. Stephenson, I. Mahjneh, G. Marconi, L. Nashef, et K. M. Bushby. 1994. « A Gene for Autosomal Recessive Limb-Girdle Muscular Dystrophy Maps to Chromosome 2p ». *Human Molecular Genetics* 3 (3): 455–457.
- Bashir, Rumaisa, Stephen Britton, Tom Strachan, Sharon Keers, Elizabeth Vafiadaki, Majlinda Lako, Isabelle Richard, et al. 1998. « A Gene Related to Caenorhabditis Elegans Spermatogenesis Factor Fer-1 Is Mutated in Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2B ». *Nature Genetics* 20 (1): 37–42. doi:10.1038/1689.
- Bastiani, Michele, et Robert G. Parton. 2010. « Caveolae at a Glance ». *Journal of Cell Science* 123 (22): 3831–3836. doi:10.1242/jcs.070102.
- Batchelor, Clare L., et Steve J. Winder. 2006. « Sparks, Signals and Shock Absorbers: How Dystrophin Loss Causes Muscular Dystrophy ». *Trends in Cell Biology* 16 (4): 198–205. doi:10.1016/j.tcb.2006.02.001.
- Beckmann, Jacques S, et Melissa Spencer. 2008. « Calpain 3, the “gatekeeper” of proper sarcomere assembly, turnover and maintenance ». *Neuromuscular disorders : NMD* 18 (12): 913–921. doi:10.1016/j.nmd.2008.08.005.

Bibliographie

- Bejaoui, K., K. Hirabayashi, F. Hentati, J. L. Haines, C. Ben Hamida, S. Belal, R. G. Miller, D. McKenna-Yasek, J. Weissenbach, et L. P. Rowland. 1995. « Linkage of Miyoshi Myopathy (distal Autosomal Recessive Muscular Dystrophy) Locus to Chromosome 2p12-14 ». *Neurology* 45 (4): 768-772.
- Belanto, Joseph J., Silvia V. Diaz-Perez, Clara E. Magyar, Michele M. Maxwell, Yasemin Yilmaz, Kasey Topp, Guney Boso, Catriona H. Jamieson, Nicholas A. Cacalano, et Christina A. M. Jamieson. 2010. « Dexamethasone Induces Dysferlin in Myoblasts and Enhances Their Myogenic Differentiation ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 20 (2): 111-121. doi:10.1016/j.nmd.2009.12.003.
- Bement, W. M., C. A. Mandato, et M. N. Kirsch. 1999. « Wound-Induced Assembly and Closure of an Actomyosin Purse String in *Xenopus* Oocytes ». *Current Biology: CB* 9 (11): 579-587.
- Benirschke, Kurt, Graham J. Burton, et Rebecca N Baergen. 2012. *Pathology of the Human Placenta*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23941-0>.
- Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, et Lubert Stryer. 2002. *Biochemistry*. 5th éd. W H Freeman.
- Bernatchez, Pascal N., Lisette Acevedo, Carlos Fernandez-Hernando, Takahisa Murata, Cecile Chalouni, Jia Kim, Hediye Erdjument-Bromage, et al. 2007. « Myoferlin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Stability and Function ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (42): 30745-30753. doi:10.1074/jbc.M704798200.
- Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, et H. Llewelyn Roderick. 2003. « Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7): 517-529. doi:10.1038/nrm1155.
- Berridge, Michael J., Peter Lipp, et Martin D. Bootman. 2000. « The Versatility and Universality of Calcium Signalling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (1): 11-21. doi:10.1038/35036035.
- Betz, R. C., B. G. Schoser, D. Kasper, K. Ricker, A. Ramírez, V. Stein, T. Torbergson, et al. 2001. « Mutations in CAV3 Cause Mechanical Hyperirritability of Skeletal Muscle in Rippling Muscle Disease ». *Nature Genetics* 28 (3): 218-219. doi:10.1038/90050.
- Betz, W. J., F. Mao, et G. S. Bewick. 1992. « Activity-Dependent Fluorescent Staining and Destaining of Living Vertebrate Motor Nerve Terminals ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 12 (2): 363-375.
- Betz, W. J., F. Mao, et C. B. Smith. 1996. « Imaging Exocytosis and Endocytosis ». *Current Opinion in Neurobiology* 6 (3): 365-371.
- Bhakdi, S., H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, M. Kehoe, et M. Palmer. 1996. « Staphylococcal Alpha-Toxin, Streptolysin-O, and Escherichia Coli Hemolysin: Prototypes of Pore-Forming Bacterial Cytolysins ». *Archives of Microbiology* 165 (2): 73-79.
- Bharadwaj, Alamelu, Moamen Bydoun, Ryan Holloway, et David Waisman. 2013. « Annexin A2 Heterotetramer: Structure and Function ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 6259-6305. doi:10.3390/ijms14036259.
- Bi, Guo-Qiang, Robert L. Morris, Guochun Liao, Janet M. Alderton, Jonathan M. Scholey, et Richard A. Steinhardt. 1997. « Kinesin- and Myosin-Driven Steps of Vesicle Recruitment for Ca²⁺-Regulated Exocytosis ». *The Journal of Cell Biology* 138 (5): 999-1008. doi:10.1083/jcb.138.5.999.
- Bischofberger, Mirko, Ioan Iacovache, et F. Gisou van der Goot. 2012. « Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response ». *Cell Host & Microbe* 12 (3): 266-275. doi:10.1016/j.chom.2012.08.005.
- Blackwood, R. A., et J. D. Ernst. 1990. « Characterization of Ca²⁺-Dependent Phospholipid Binding, Vesicle Aggregation and Membrane Fusion by Annexins ». *The Biochemical Journal* 266 (1): 195-200.
- Blake, Derek J., Andrew Weir, Sarah E. Newey, et Kay E. Davies. 2002. « Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle ». *Physiological Reviews* 82 (2): 291-329. doi:10.1152/physrev.00028.2001.

Bibliographie

- Blandin, Gaele, Christophe Beroud, Veronique Labelle, Karine Nguyen, Nicolas Wein, Dalil Hamroun, Brad Williams, et al. 2012. « UMD-DYSF, a Novel Locus Specific Database for the Compilation and Interactive Analysis of Mutations in the Dysferlin Gene ». *Human Mutation* 33 (3): E2317–E231. doi:10.1002/humu.22015.
- Boczonadi, Veronika, et Arto Määttä. 2012. « Annexin A9 is a periplakin interacting partner in membrane-targeted cytoskeletal linker protein complexes ». *FEBS Letters* 586 (19): 3090–3096. doi:10.1016/j.febslet.2012.07.057.
- Boesze-Battaglia, K., et R. Schimmel. 1997. « Cell Membrane Lipid Composition and Distribution: Implications for Cell Function and Lessons Learned from Photoreceptors and Platelets ». *The Journal of Experimental Biology* 200 (Pt 23): 2927–2936.
- Bolte, S., C. Talbot, Y. Boute, O. Catrice, N. D. Read, et B. Satiat-Jeunemaitre. 2004. « FM-Dyes as Experimental Probes for Dissecting Vesicle Trafficking in Living Plant Cells ». *Journal of Microscopy* 214 (Pt 2): 159–173. doi:10.1111/j.0022-2720.2004.01348.x.
- Borden, K. L. 1998. « RING Fingers and B-Boxes: Zinc-Binding Protein-Protein Interaction Domains ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 76 (2-3): 351–358.
- Borgonovo, Barbara, Emanuele Cocucci, Gabriella Racchetti, Paola Podini, Angela Bachi, et Jacopo Meldolesi. 2002. « Regulated Exocytosis: A Novel, Widely Expressed System ». *Nature Cell Biology* 4 (12): 955–963. doi:10.1038/ncb888.
- Bouter, Anthony, Céline Gounou, Rémi Bérat, Sisareuth Tan, Bernard Gallois, Thierry Granier, Béatrice Langlois d'Estaintot, Ernst Pöschl, Bent Brachvogel, et Alain R. Brisson. 2011. « Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair ». *Nature Communications* 2 (avril): 270. doi:10.1038/ncomms1270.
- Bradford, M. M. 1976. « A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding ». *Analytical Biochemistry* 72 (mai): 248–254.
- Brown, D. A., et J. K. Rose. 1992. « Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface ». *Cell* 68 (3): 533–544.
- Brummelkamp, Thijn R., René Bernards, et Reuven Agami. 2002. « A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5567): 550–553. doi:10.1126/science.1068999.
- Bruno, Claudio, Federica Sotgia, Elisabetta Gazzerro, Carlo Minetti, et Michael P. Lisanti. 1993. « Caveolinopathies ». In *GeneReviews*(®), édité par Roberta A. Pagon, Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Stephanie E. Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D. Bird, et al. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1385/>.
- Buckingham, Margaret, Lola Bajard, Ted Chang, Philippe Daubas, Juliette Hadchouel, Sigolène Meilhac, Didier Montarras, Didier Rocancourt, et Frédéric Relaix. 2003. « The formation of skeletal muscle: from somite to limb ». *Journal of Anatomy* 202 (1): 59–68. doi:10.1046/j.1469-7580.2003.00139.x.
- Burton, Graham J., et Carolyn J. P. Jones. 2009. « Syncytial Knots, Sprouts, Apoptosis, and Trophoblast Deportation from the Human Placenta ». *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 48 (1): 28–37. doi:10.1016/S1028-4559(09)60032-2.
- Cagliani, R., N. Bresolin, A. Prella, A. Gallanti, F. Fortunato, M. Sironi, P. Ciscato, et al. 2003. « A CAV3 Microdeletion Differentially Affects Skeletal Muscle and Myocardium ». *Neurology* 61 (11): 1513–1519.
- Cai, Chuanxi, Haruko Masumiya, Noah Weisleder, Noriyuki Matsuda, Miyuki Nishi, MoonSun Hwang, Jae-Kyun Ko, et al. 2009a. « MG53 Nucleates Assembly of Cell Membrane Repair Machinery ». *Nature Cell Biology* 11 (1): 56–64. doi:10.1038/ncb1812.
- Cai, Chuanxi, Noah Weisleder, Jae-Kyun Ko, Shinji Komazaki, Yoshihide Sunada, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, et Jianjie Ma. 2009b. « Membrane Repair Defects in Muscular Dystrophy Are Linked to Altered Interaction between MG53, Caveolin-3, and Dysferlin ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (23): 15894–15902. doi:10.1074/jbc.M109.009589.

Bibliographie

- Campbell, Anthony K. 2014. *Intracellular Calcium*. John Wiley & Sons.
- Carbone, I., C. Bruno, F. Sotgia, M. Bado, P. Broda, E. Masetti, A. Panella, et al. 2000. « Mutation in the CAV3 Gene Causes Partial Caveolin-3 Deficiency and hyperCKemia ». *Neurology* 54 (6): 1373-1376.
- Carmeille, Romain, Séverine A. Degrelle, Laurent Plawinski, Flora Bouvet, Céline Gounou, Danièle Evain-Brion, Alain R. Brisson, et Anthony Bouter. 2015. « Annexin-A5 Promotes Membrane Resealing in Human Trophoblasts ». *Biochimica Et Biophysica Acta*, janvier. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.12.038.
- Cascales, Eric, Susan K. Buchanan, Denis Duché, Colin Kleanthous, Roland Lloubès, Kathleen Postle, Margaret Riley, Stephen Slatin, et Danièle Cavard. 2007. « Colicin Biology ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 71 (1): 158-229. doi:10.1128/MMBR.00036-06.
- Céline Raguene-Nicol, Françoise Russo-Marie. 2002. « LES ANNEXINES CHEZ L'HOMME ». *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités* 172: 111-118.
- Chakrabarti, Sabyasachi, Koichi S. Kobayashi, Richard A. Flavell, Carolyn B. Marks, Katsuya Miyake, David R. Liston, Kimberly T. Fowler, Fred S. Gorelick, et Norma W. Andrews. 2003. « Impaired Membrane Resealing and Autoimmune Myositis in Synaptotagmin VII-Deficient Mice ». *The Journal of Cell Biology* 162 (4): 543-549. doi:10.1083/jcb.200305131.
- Chambers, Robert. 1917. « Microdissection Studies ». *American Journal of Physiology -- Legacy Content* 43 (1): 1-12.
- Chapman, Edwin R. 2008. « How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release? » *Annual Review of Biochemistry* 77 (1): 615-641. doi:10.1146/annurev.biochem.77.062005.101135.
- Cheng, Xiping, Xiaoli Zhang, Qiong Gao, Mohammad Ali Samie, Marlene Azar, Wai Lok Tsang, Libing Dong, et al. 2014. « The Intracellular Ca²⁺ Channel MCOLN1 Is Required for Sarcolemma Repair to Prevent Muscular Dystrophy ». *Nature Medicine* 20 (10): 1187-1192. doi:10.1038/nm.3611.
- Chernomordik, Leonid V., et Michael M. Kozlov. 2003. « Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes ». *Annual Review of Biochemistry* 72 (1): 175-207. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161504.
- Cho, Wonhwa. 2001. « Membrane Targeting by C1 and C2 Domains ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (35): 32407-32410. doi:10.1074/jbc.R100007200.
- Christ, B., et C. P. Ordahl. 1995. « Early Stages of Chick Somite Development ». *Anatomy and Embryology* 191 (5): 381-396.
- Clarke, M. S., R. W. Caldwell, H. Chiao, K. Miyake, et P. L. McNeil. 1995. « Contraction-Induced Cell Wounding and Release of Fibroblast Growth Factor in Heart ». *Circulation Research* 76 (6): 927-934.
- Clark, Kathleen A., Abigail S. McElhinny, Mary C. Beckerle, et Carol C. Gregorio. 2002. « Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18: 637-706. doi:10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840.
- Clegg, C. H., T. A. Linkhart, B. B. Olwin, et S. D. Hauschka. 1987. « Growth Factor Control of Skeletal Muscle Differentiation: Commitment to Terminal Differentiation Occurs in G1 Phase and Is Repressed by Fibroblast Growth Factor ». *The Journal of Cell Biology* 105 (2): 949-956.
- Cocucci, Emanuele, Gabriella Racchetti, Paola Podini, et Jacopo Meldolesi. 2007. « Enlargeosome Traffic: Exocytosis Triggered by Various Signals Is Followed by Endocytosis, Membrane Shedding or Both ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (6): 742-757. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00566.x.
- Collins, C. A., et J. E. Morgan. 2003. « Duchenne's Muscular Dystrophy: Animal Models Used to Investigate Pathogenesis and Develop Therapeutic Strategies ». *International Journal of Experimental Pathology* 84 (4): 165-172.
- Comera, C., et F. Russomarie. 1995. « Glucocorticoid-Induced Annexin-1 Secretion by Monocytes and Peritoneal Leukocytes ». *British Journal of Pharmacology* 115 (6): 1043-1047.
- Concha, N. O., J. F. Head, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman, et B. A. Seaton. 1993. « Rat Annexin V Crystal Structure: Ca(2+)-Induced Conformational Changes ». *Science (New York, N.Y.)* 261 (5126): 1321-1324.

Bibliographie

- Cooper, Sandra T., et Paul L. McNeil. 2015. « Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology ». *Physiological Reviews* 95 (4): 1205–40. doi:10.1152/physrev.00037.2014.
- Corrotte, Matthias, Patricia E. Almeida, Christina Tam, Thiago Castro-Gomes, Maria Cecilia Fernandes, Bryan A. Millis, Mauro Cortez, et al. 2013. « Caveolae Internalization Repairs Wounded Cells and Muscle Fibers ». *eLife* 2: e00926. doi:10.7554/eLife.00926.
- Corrotte, Matthias, Maria Cecilia Fernandes, Christina Tam, et Norma W. Andrews. 2012. « Toxin Pores Endocytosed during Plasma Membrane Repair Traffic into the Lumen of MVBs for Degradation ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (3): 483–94. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01323.x.
- « Cortical actin networks induce spatio-temporal confinement of phospholipids in the plasma membrane – a minimally invasive investigation by STED-FCS : Scientific Reports ». 2015. Consulté le septembre 16. <http://www.nature.com/articles/srep11454>.
- Craxton, Molly. 2001. « Genomic Analysis of Synaptotagmin Genes ». *Genomics* 77 (1–2): 43–49. doi:10.1006/geno.2001.6619.
- Creutz, C. E., C. J. Pazoles, et H. B. Pollard. 1978. « Identification and Purification of an Adrenal Medullary Protein (synexin) That Causes Calcium-Dependent Aggregation of Isolated Chromaffin Granules ». *The Journal of Biological Chemistry* 253 (8): 2858–66.
- Cronk, Lisa B., Bin Ye, Toshihiko Kaku, David J. Tester, Matteo Vatta, Jonathan C. Makielski, et Michael J. Ackerman. 2007. « A Novel Mechanism for Sudden Infant Death Syndrome (SIDS): Persistent Late Sodium Current Secondary to Mutations in Caveolin-3 ». *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society* 4 (2): 161–66. doi:10.1016/j.hrthm.2006.11.030.
- Crosbie, R. H., H. Yamada, D. P. Venzke, M. P. Lisanti, et K. P. Campbell. 1998. « Caveolin-3 Is Not an Integral Component of the Dystrophin Glycoprotein Complex ». *FEBS Letters* 427 (2): 279–82.
- Cvrckova, Fatima. 2013. « Formins and membranes: anchoring cortical actin to the cell wall and beyond ». *Plant Traffic and Transport* 4: 436. doi:10.3389/fpls.2013.00436.
- « Cytoskeletal Mechanics | Biological Physics and Soft Matter Physics | Cambridge University Press ». 2015. Consulté le septembre 16. <http://www.cambridge.org/hn/academic/subjects/physics/biological-physics-and-soft-matter-physics/cytoskeletal-mechanics-models-and-measurements-cell-mechanics>.
- D'Acquisto, F, M Perretti, et R J Flower. 2008. « Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems ». *British Journal of Pharmacology* 155 (2): 152–69. doi:10.1038/bjp.2008.252.
- Dancker, P., I. Löw, W. Hasselbach, et T. Wieland. 1975. « Interaction of Actin with Phalloidin: Polymerization and Stabilization of F-Actin ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 400 (2): 407–14.
- Davies, Kay E., et Kristen J. Nowak. 2006. « Molecular Mechanisms of Muscular Dystrophies: Old and New Players ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (10): 762–73. doi:10.1038/nrm2024.
- Davis, Dawn Belt, Anthony J. Delmonte, Chantal T. Ly, et Elizabeth M. McNally. 2000. « Myoferlin, a Candidate Gene and Potential Modifier of Muscular Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 9 (2): 217–26. doi:10.1093/hmg/9.2.217.
- Davis, T. A., B. Loos, et A. -M. Engelbrecht. 2014. « AHNAK: The giant jack of all trades ». *Cellular Signalling* 26 (12): 2683–93. doi:10.1016/j.cellsig.2014.08.017.
- Dennis, M J. 1981. « Development of the Neuromuscular Junction: Inductive Interactions Between Cells ». *Annual Review of Neuroscience* 4 (1): 43–68. doi:10.1146/annurev.ne.04.030181.000355.
- Detrait, Eric, Christopher S. Eddleman, SoonMoon Yoo, Mitsunori Fukuda, Michael P. Nguyen, George D. Bittner, et Harvey M. Fishman. 2000. « Axolemmal Repair Requires Proteins That Mediate Synaptic Vesicle Fusion ». *Journal of Neurobiology* 44 (4): 382–91. doi:10.1002/1097-4695(20000915)44:4<382::AID-NEU2>3.0.CO;2-Q.

Bibliographie

- Diz-Muñoz, Alba, Daniel A. Fletcher, et Orion D. Weiner. 2013. « Use the force: Membrane tension as an organizer of cell shape and motility ». *Trends in cell biology* 23 (2): 47-53. doi:10.1016/j.tcb.2012.09.006.
- Doherty, Katherine R., Andrew Cave, Dawn Belt Davis, Anthony J. Delmonte, Avery Posey, Judy U. Earley, Michele Hadhazy, et Elizabeth M. McNally. 2005. « Normal Myoblast Fusion Requires Myoferlin ». *Development* 132 (24): 5565-5575. doi:10.1242/dev.02155.
- Donato, R., B.R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D.J. Weber, et C.L. Geczy. 2013. « Functions of S100 Proteins ». *Current molecular medicine* 13 (1): 24-57.
- Dong, Zheng, Pothana Saikumar, Joel M. Weinberg, et Manjeri A. Venkatachalam. 2006. « Calcium in Cell Injury and Death ». *Annual Review of Pathology* 1: 405-434. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100218.
- Dotti, M. Teresa, Alessandro Malandrini, Simona Gambelli, Claudio Salvadori, Nicola De Stefano, et Antonio Federico. 2006. « A New Missense Mutation in Caveolin-3 Gene Causes Rippling Muscle Disease ». *Journal of the Neurological Sciences* 243 (1-2): 61-64. doi:10.1016/j.jns.2005.11.032.
- Draeger, Annette, et Eduard B. Babiychuk. 2013. « Ceramide in Plasma Membrane Repair ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 216: 341-53. doi:10.1007/978-3-7091-1511-4_17.
- Draeger, Annette, Katia Monastyrskaya, et Eduard B. Babiychuk. 2011a. « Plasma membrane repair and cellular damage control: The annexin survival kit ». *Biochemical Pharmacology* 81 (6): 703-712. doi:10.1016/j.bcp.2010.12.027.
- Draeger, Annette, Roman Schoenauer, Alexander P. Atanassoff, Heidi Wolfmeier, et Eduard B. Babiychuk. 2014. « Dealing with damage: Plasma membrane repair mechanisms ». *Biochimie*. Consulté le septembre 20. doi:10.1016/j.biochi.2014.08.008.
- Dulhunty, A. F., et C. Franzini-Armstrong. 1975. « The Relative Contributions of the Folds and Caveolae to the Surface Membrane of Frog Skeletal Muscle Fibres at Different Sarcomere Lengths ». *The Journal of Physiology* 250 (3): 513-539.
- Duncan, J L, et L Buckingham. 1978. « Increased resistance to streptolysin O in mammalian cells treated with oxygenated derivatives of cholesterol. » *Infection and Immunity* 22 (1): 94-100.
- Eberhard, David A., Larry R. Karns, Scott R. VandenBerg, et Carl E. Creutz. 2001. « Control of the Nuclear-Cytoplasmic Partitioning of Annexin II by a Nuclear Export Signal and by p11 Binding ». *Journal of Cell Science* 114 (17): 3155-3166.
- Edidin, Michael. 2003. « Lipids on the Frontier: A Century of Cell-Membrane Bilayers ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (5): 414-418. doi:10.1038/nrm1102.
- Elbashir, Sayda M., Jens Harborth, Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin, Klaus Weber, et Thomas Tuschl. 2001. « Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells ». *Nature* 411 (6836): 494-498. doi:10.1038/35078107.
- Ervasti, James M. 2007. « Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, The Muscular Dystrophies: Molecular Basis and Therapeutic Strategies*, 1772 (2): 108-117. doi:10.1016/j.bbdis.2006.05.010.
- Escobedo, Joel, et Timothy J. Koh. 2003. « Improved Transfection Technique for Adherent Cells Using a Commercial Lipid Reagent ». *BioTechniques* 35 (5): 936-938, 940.
- Evans, T. C., et G. L. Nelsestuen. 1994. « Calcium and Membrane-Binding Properties of Monomeric and Multimeric Annexin II ». *Biochemistry* 33 (45): 13231-13238.
- « Explorations into the Nature of the Living Cell. : Academic Medicine ». 2015. LWW. Consulté le juin 18. http://journals.lww.com/academicmedicine/Fulltext/1961/08000/Explorations_into_the_Nature_of_the_Living_Cell_.46.aspx.
- Faiß, Simon, Katja Kastl, Andreas Janshoff, et Claudia Steinem. 2008. « Formation of irreversibly bound annexin A1 protein domains on POPC/POPS solid supported membranes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Protein Modulation of Membrane Structure*, 1778 (7-8): 1601-1610. doi:10.1016/j.bbamem.2008.01.003.

Bibliographie

- Fee, Dominic B., Yuen T. So, Carlos Barraza, Karla P. Figueroa, et Stefan-M. Pulst. 2004. « Phenotypic Variability Associated with Arg26Gln Mutation in caveolin3 ». *Muscle & Nerve* 30 (3): 375-378. doi:10.1002/mus.20092.
- Figarella-Branger, D., J. Pouget, R. Bernard, M. Krahn, C. Fernandez, N. Lévy, et J. F. Pellissier. 2003. « Limb-Girdle Muscular Dystrophy in a 71-Year-Old Woman with an R27Q Mutation in the CAV3 Gene ». *Neurology* 61 (4): 562-564.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, et C. C. Mello. 1998. « Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans* ». *Nature* 391 (6669): 806-811. doi:10.1038/35888.
- Fischer, Dirk, Anja Schroers, Ingmar Blümcke, Horst Urbach, Klaus Zerres, Wilhelm Mortier, Matthias Vorgerd, et Rolf Schröder. 2003. « Consequences of a Novel Caveolin-3 Mutation in a Large German Family ». *Annals of Neurology* 53 (2): 233-241. doi:10.1002/ana.10442.
- Flaherty, M. J., S. West, R. L. Heimark, K. Fujikawa, et J. F. Tait. 1990. « Placental Anticoagulant Protein-I: Measurement in Extracellular Fluids and Cells of the Hemostatic System ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 115 (2): 174-181.
- Fleckenstein, A., J. Janke, H. J. Döring, et O. Leder. 1974. « Myocardial Fiber Necrosis due to Intracellular Ca Overload-a New Principle in Cardiac Pathophysiology ». *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism* 4: 563-580.
- Frank, G. B. 1960. « Effects of changes in extracellular calcium concentration on the potassium-induced contracture of frog's skeletal muscle ». *The Journal of Physiology* 151 (3): 518-538.
- Fratti, Rutilio A., Youngsoo Jun, Alexey J. Merz, Nathan Margolis, et William Wickner. 2004. « Interdependent Assembly of Specific Regulatory Lipids and Membrane Fusion Proteins into the Vertex Ring Domain of Docked Vacuoles ». *The Journal of Cell Biology* 167 (6): 1087-1098. doi:10.1083/jcb.200409068.
- Fulizio, Luigi, Anna Chiara Nascimbeni, Marina Fanin, Giulio Piluso, Luisa Politano, Vincenzo Nigro, et Corrado Angelini. 2005. « Molecular and Muscle Pathology in a Series of Caveolinopathy Patients ». *Human Mutation* 25 (1): 82-89. doi:10.1002/humu.20119.
- Funakoshi, T., R. L. Heimark, L. E. Hendrickson, B. A. McMullen, et K. Fujikawa. 1987. « Human Placental Anticoagulant Protein: Isolation and Characterization ». *Biochemistry* 26 (17): 5572-5578.
- Gaëlle Blandin, Céline Guien. 2014. « La Base de Données Internationale pour les Dysferlinopathies est opérationnelle ». *Les cahiers de myologie*, n° 11: 16-18.
- Galbiati, Ferruccio, Daniela Volonté, Jeffrey A. Engelman, Philipp E. Scherer, et Michael P. Lisanti. 1999. « Targeted Down-Regulation of Caveolin-3 Is Sufficient to Inhibit Myotube Formation in Differentiating C2C12 Myoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 30315-30321. doi:10.1074/jbc.274.42.30315.
- Galbiati, Ferruccio, Daniela Volonté, Carlo Minetti, David B. Bregman, et Michael P. Lisanti. 2000. « Limb-Girdle Muscular Dystrophy (LGMD-1C) Mutants of Caveolin-3 Undergo Ubiquitination and Proteasomal Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 275 (48): 37702-37711. doi:10.1074/jbc.M006657200.
- Galbiati, F., B. Razani, et M. P. Lisanti. 2001. « Caveolae and Caveolin-3 in Muscular Dystrophy ». *Trends in Molecular Medicine* 7 (10): 435-441.
- Galbiati, F., D. Volonte, C. Minetti, J. B. Chu, et M. P. Lisanti. 1999. « Phenotypic Behavior of Caveolin-3 Mutations That Cause Autosomal Dominant Limb Girdle Muscular Dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGMD-1C Caveolin-3 Mutants within the Golgi Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (36): 25632-25641.
- Gallagher, Dymrna, Daniel Belmonte, Paul Deurenberg, Zimian Wang, Norman Krasnow, F. Xavier Pi-Sunyer, et Steven B. Heymsfield. 1998. « Organ-Tissue Mass Measurement Allows Modeling of REE and Metabolically Active Tissue Mass ». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 275 (2): E249-E258.
- Gazzerro, Elisabetta, Federica Sotgia, Claudio Bruno, Michael P Lisanti, et Carlo Minetti. 2010. « Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases ». *European Journal of Human Genetics* 18 (2): 137-145. doi:10.1038/ejhg.2009.103.

Bibliographie

- Gerke, Volker, Carl E. Creutz, et Stephen E. Moss. 2005. « Annexins: Linking Ca²⁺ Signalling to Membrane Dynamics ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (6): 449-61. doi:10.1038/nrm1661.
- Gerke, Volker, et Stephen E. Moss. 2002. « Annexins: From Structure to Function ». *Physiological Reviews* 82 (2): 331-71. doi:10.1152/physrev.00030.2001.
- Glover, Louise, et Robert H. Brown. 2007. « Dysferlin in Membrane Trafficking and Patch Repair ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (7): 785-94. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00573.x.
- Goldberg, Burton, et Howard Green. 1959. « the cytotoxic action of immune gamma globulin and complement on krebs ascites tumor cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 109 (5): 505-10.
- Gowrishankar, Kripa, Subhasri Ghosh, Suvrajit Saha, Rumamol C., Satyajit Mayor, et Madan Rao. 2012. « Active Remodeling of Cortical Actin Regulates Spatiotemporal Organization of Cell Surface Molecules ». *Cell* 149 (6): 1353-67. doi:10.1016/j.cell.2012.05.008.
- Grütter, Christian, Christophe Briand, Guido Capitani, Peer R. E. Mittl, Stephanie Papin, Jürg Tschopp, et Markus G. Grütter. 2006. « Structure of the PRYSPRY-domain: Implications for autoinflammatory diseases ». *FEBS Letters* 580 (1): 99-106. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.076.
- Gude, Neil M., Claire T. Roberts, Bill Kalionis, et Roger G. King. 2004. « Growth and Function of the Normal Human Placenta ». *Thrombosis Research* 114 (5-6): 397-407. doi:10.1016/j.thromres.2004.06.038.
- Gurdon, J. B., P. Lemaire, et K. Kato. 1993. « Community effects and related phenomena in development ». *Cell* 75 (5): 831-34. doi:10.1016/0092-8674(93)90526-V.
- Gutiérrez, Luis M. 2012. « New Insights into the Role of the Cortical Cytoskeleton in Exocytosis from Neuroendocrine Cells ». *International review of cell and molecular biology* 295: 109-37. doi:10.1016/B978-0-12-394306-4.00009-5.
- Hannun, Yusuf A., et Lina M. Obeid. 2008. « Principles of Bioactive Lipid Signalling: Lessons from Sphingolipids ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2): 139-50. doi:10.1038/nrm2329.
- Hayashi, Takeharu, Takuro Arimura, Kazuo Ueda, Hiroki Shibata, Shigeru Hohda, Megumi Takahashi, Hisae Hori, et al. 2004. « Identification and Functional Analysis of a Caveolin-3 Mutation Associated with Familial Hypertrophic Cardiomyopathy ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (1): 178-84.
- Hayer, Arnold, Miriam Stoeber, Christin Bissig, et Ari Helenius. 2010. « Biogenesis of Caveolae: Stepwise Assembly of Large Caveolin and Cavin Complexes ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (3): 361-82. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.01023.x.
- Hayflick, L., et P. S. Moorhead. 1961. « The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains ». *Experimental Cell Research* 25 (décembre): 585-621.
- Hedges, S. Blair. 2002. « The Origin and Evolution of Model Organisms ». *Nature Reviews Genetics* 3 (11): 838-49. doi:10.1038/nrg929.
- Henson, Peter M., Donna L. Bratton, et Valerie A. Fadok. 2001. « The Phosphatidylserine Receptor: A Crucial Molecular Switch? ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (8): 627-33. doi:10.1038/35085094.
- Hernández-Deviez, Delia J., Sally Martin, Steven H. Laval, Harriet P. Lo, Sandra T. Cooper, Kathryn N. North, Kate Bushby, et Robert G. Parton. 2006. « Aberrant Dysferlin Trafficking in Cells Lacking Caveolin or Expressing Dystrophy Mutants of Caveolin-3 ». *Human Molecular Genetics* 15 (1): 129-42. doi:10.1093/hmg/ddi434.
- Herrmann, R., V. Straub, M. Blank, C. Kutzick, N. Franke, E. N. Jacob, H. G. Lenard, S. Kröger, et T. Voit. 2000. « Dissociation of the Dystroglycan Complex in Caveolin-3-Deficient Limb Girdle Muscular Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 9 (15): 2335-40.
- Hightower, Robin C., et Richard B. Meagher. 1986. « The Molecular Evolution of Actin ». *Genetics* 114 (1): 315-32.
- Hinshaw, Jenny E., Bridget O. Carragher, et Ronald A. Milligan. 1992. « Architecture and design of the nuclear pore complex ». *Cell* 69 (7): 1133-41. doi:10.1016/0092-8674(92)90635-P.

Bibliographie

- Hodgkin, A. L., et P. Horowicz. 1960. « Potassium contractures in single muscle fibres ». *The Journal of Physiology* 153 (2): 386-403.
- Hoffman, J. F. 1992. « On Red Blood Cells, Hemolysis and Resealed Ghosts ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 326: 1-15.
- Holopainen, J. M., M. I. Angelova, et P. K. Kinnunen. 2000. « Vectorial Budding of Vesicles by Asymmetrical Enzymatic Formation of Ceramide in Giant Liposomes ». *Biophysical Journal* 78 (2): 830-838. doi:10.1016/S0006-3495(00)76640-9.
- Hong, Wanjin. 2005. « SNAREs and traffic ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1744 (2): 120-144. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.03.014.
- Hong, Wanjin, et Sima Lev. 2014. « Tethering the assembly of SNARE complexes ». *Trends in Cell Biology*, Special Issue: Membrane Trafficking, 24 (1): 35-43. doi:10.1016/j.tcb.2013.09.006.
- Huang, Yanchao, Steven H. Laval, Alexandra van Remoortere, Jacques Baudier, Chriselle Benaud, Louise V. B. Anderson, Volker Straub, et al. 2007. « AHNK, a Novel Component of the Dysferlin Protein Complex, Redistributes to the Cytoplasm with Dysferlin during Skeletal Muscle Regeneration ». *The FASEB Journal* 21 (3): 732-742. doi:10.1096/fj.06-6628com.
- Huang, Yanchao, Antoine de Morrée, Alexandra van Remoortere, Kate Bushby, Rune R. Frants, Johan Tden Dunnen, et Silvere M. van der Maarel. 2008. « Calpain 3 Is a Modulator of the Dysferlin Protein Complex in Skeletal Muscle ». *Human Molecular Genetics* 17 (12): 1855-1866. doi:10.1093/hmg/ddn081.
- Huang, Yanchao, Peter Verheesen, Andreas Roussis, Wendy Frankhuizen, Ieke Ginjaar, Faye Haldane, Steve Laval, et al. 2005. « Protein Studies in Dysferlinopathy Patients Using Llama-Derived Antibody Fragments Selected by Phage Display ». *European Journal of Human Genetics* 13 (6): 721-730. doi:10.1038/sj.ejhg.5201414.
- Huber, R, J Römisch, et E P Paques. 1990. « The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. » *The EMBO Journal* 9 (12): 3867-74.
- Hui, Enfu, Jihong Bai, et Edwin R. Chapman. 2006. « Ca²⁺-Triggered Simultaneous Membrane Penetration of the Tandem C2-Domains of Synaptotagmin I ». *Biophysical Journal* 91 (5): 1767-77. doi:10.1529/biophysj.105.080325.
- Huppertz, B., H. G. Frank, J. C. Kingdom, F. Reister, et P. Kaufmann. 1998. « Villous Cytotrophoblast Regulation of the Syncytial Apoptotic Cascade in the Human Placenta ». *Histochemistry and Cell Biology* 110 (5): 495-508.
- Hurley, James H. 2010. « The ESCRT Complexes ». *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45 (6): 463-87. doi:10.3109/10409238.2010.502516.
- Husmann, Matthias, Erik Beckmann, Klaus Boller, Nicole Kloft, Stefan Tenzer, Wiesia Bobkiewicz, Claudia Neukirch, Hagan Bayley, et Sucharit Bhakdi. 2009. « Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis ». *FEBS Letters* 583 (2): 337-44. doi:10.1016/j.febslet.2008.12.028.
- Hutter, O. F., et Krista Kostial. 1954. « Effect of magnesium and calcium ions on the release of acetylcholine ». *The Journal of Physiology* 124 (2): 234-41.
- Idone, Vincent, Christina Tam, John W. Goss, Derek Toomre, Marc Pypaert, et Norma W. Andrews. 2008. « Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis ». *The Journal of Cell Biology* 180 (5): 905-14. doi:10.1083/jcb.200708010.
- Illa, I., N. De Luna, R. Domínguez-Perles, R. Rojas-García, C. Paradas, J. Palmer, C. Márquez, P. Gallano, et E. Gallardo. 2007. « Symptomatic Dysferlin Gene Mutation Carriers: Characterization of Two Cases ». *Neurology* 68 (16): 1284-89. doi:10.1212/01.wnl.0000256768.79353.60.
- Ingber, D E, J A Madri, et J D Jamieson. 1981. « Role of basal lamina in neoplastic disorganization of tissue architecture. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (6): 3901-5.
- Ingber, Donald E. 2003a. « Tensegrity I. Cell Structure and Hierarchical Systems Biology ». *Journal of Cell Science* 116 (7): 1157-73. doi:10.1242/jcs.00359.

Bibliographie

- Ingber, Donald E. . 2003b. « Tensegrity II. How Structural Networks Influence Cellular Information Processing Networks ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 8): 1397-1408.
- Jaalouk, Diana E., et Jan Lammerding. 2009. « Mechanotransduction Gone Awry ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (1): 63-73. doi:10.1038/nrm2597.
- Jaiswal, Jyoti K., Stine P. Lauritzen, Luana Scheffer, Masakiyo Sakaguchi, Jakob Bunkenborg, Sanford M. Simon, Tuula Kallunki, Marja Jäättelä, et Jesper Nylandsted. 2014. « S100A11 Is Required for Efficient Plasma Membrane Repair and Survival of Invasive Cancer Cells ». *Nature Communications* 5 (mai). doi:10.1038/ncomms4795.
- Janssen, Ian, Steven B. Heymsfield, ZiMian Wang, et Robert Ross. 2000. « Skeletal Muscle Mass and Distribution in 468 Men and Women Aged 18–88 Yr ». *Journal of Applied Physiology* 89 (1): 81-88.
- Jaqaman, Khuloud, et Sergio Grinstein. 2012. « Regulation from within: the cytoskeleton in transmembrane signaling ». *Trends in cell biology* 22 (10): 515-26. doi:10.1016/j.tcb.2012.07.006.
- Jedd, G., et N. H. Chua. 2000. « A New Self-Assembled Peroxisomal Vesicle Required for Efficient Resealing of the Plasma Membrane ». *Nature Cell Biology* 2 (4): 226-31. doi:10.1038/35008652.
- Jimenez, Ana Joaquina, Paolo Maiuri, Julie Lafaurie-Janvore, Séverine Divoux, Matthieu Piel, et Franck Perez. 2014. « ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair ». *Science* 343 (6174): 1247136. doi:10.1126/science.1247136.
- Johansen, M., C. W. Redman, T. Wilkins, et I. L. Sargent. 1999. « Trophoblast Deportation in Human Pregnancy--Its Relevance for Pre-Eclampsia ». *Placenta* 20 (7): 531-39. doi:10.1053/plac.1999.0422.
- Kaetzel, M. A., Y. D. Mo, T. R. Mealy, B. Campos, W. Bergsma-Schutter, A. Brisson, J. R. Dedman, et B. A. Seaton. 2001. « Phosphorylation Mutants Elucidate the Mechanism of Annexin IV-Mediated Membrane Aggregation ». *Biochemistry* 40 (13): 4192-99.
- Kaneko, Noboru, Ryuko Matsuda, Saichi Hosoda, Tadahiro Kajita, et Yohsuke Ohta. 1996. « Measurement of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction ». *Clinica Chimica Acta* 251 (1): 65-80. doi:10.1016/0009-8981(96)06294-8.
- Keyel, Peter A., Robyn Roth, Wayne M. Yokoyama, John E. Heuser, et Russell D. Salter. 2013. « Reduction of Streptolysin O (SLO) Pore-Forming Activity Enhances Inflammasome Activation ». *Toxins* 5 (6): 1105-18. doi:10.3390/toxins5061105.
- Klinge, Lars, John Harris, Caroline Sewry, Richard Charlton, Louise Anderson, Steve Laval, Yen-Hui Chiu, et al. 2010. « Dysferlin Associates with the Developing T-Tubule System in Rodent and Human Skeletal Muscle ». *Muscle & Nerve* 41 (2): 166-73. doi:10.1002/mus.21166.
- K M Bushby, J. S. Beckmann. 1995. « The limb-girdle muscular dystrophies - proposal for a new nomenclature ». *Neuromuscular disorders : NMD* 5 (4): 337-43.
- Knight, M., C. W. Redman, E. A. Linton, et I. L. Sargent. 1998. « Shedding of Syncytiotrophoblast Microvilli into the Maternal Circulation in Pre-Eclamptic Pregnancies ». *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 105 (6): 632-40.
- Krahn, Martin, Nicolas Wein, Marc Bartoli, William Lostal, Sébastien Courier, Nathalie Bourg-Alibert, Karine Nguyen, et al. 2010. « A Naturally Occurring Human Minidysferlin Protein Repairs Sarcolemmal Lesions in a Mouse Model of Dysferlinopathy ». *Science Translational Medicine* 2 (50): 50ra69. doi:10.1126/scitranslmed.3000951.
- Krikun, G., C. J. Lockwood, X. X. Wu, X. D. Zhou, S. Guller, C. Calandri, A. Guha, Y. Nemerson, et J. H. Rand. 1994. « The Expression of the Placental Anticoagulant Protein, Annexin V, by Villous Trophoblasts: Immunolocalization and in Vitro Regulation ». *Placenta* 15 (6): 601-12.
- Kubisch, Christian, Uwe-Peter Ketelsen, Ingrid Goebel, et Heymut Omran. 2005. « Autosomal Recessive Rippling Muscle Disease with Homozygous CAV3 Mutations ». *Annals of Neurology* 57 (2): 303-4. doi:10.1002/ana.20350.
- Kubisch, Christian, Benedikt G. H. Schoser, Monika von Düring, Regina C. Betz, Hans-Hilmar Goebel, Susanne Zahn, Antje Ehrbrecht, et al. 2003. « Homozygous Mutations in Caveolin-3

Bibliographie

- Cause a Severe Form of Rippling Muscle Disease ». *Annals of Neurology* 53 (4): 512-520. doi:10.1002/ana.10501.
- Kurreck, Jens. 2009. « RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 48 (8): 1378-1398. doi:10.1002/anie.200802092.
- Laemmli, U. K. 1970. « Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 ». *Nature* 227 (5259): 680-685. doi:10.1038/227680a0.
- Lambert, Olivier, Nükhet Cavusoglu, Jacques Gally, Michel Vincent, Jean Louis Rigaud, Jean-Pierre Henry, et Jesus Ayala-Sanmartin. 2004. « Novel Organization and Properties of Annexin 2-Membrane Complexes ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 10872-10882. doi:10.1074/jbc.M313657200.
- Lamothe, B, A Baudry, C. T Christoffersen, P De Meyts, J Jami, D Bucchini, et R. L Joshi. 1998. « Insulin receptor-deficient cells as a new tool for dissecting complex interplay in insulin and insulin-like growth factors ». *FEBS Letters* 426 (3): 381-385. doi:10.1016/S0014-5793(98)00377-9.
- Langbein, Manuela, Reiner Strick, Pamela L. Strissel, Nicole Vogt, Hans Parsch, Matthias W. Beckmann, et Ralf L. Schild. 2008. « Impaired Cytotrophoblast Cell-Cell Fusion Is Associated with Reduced Syncytin and Increased Apoptosis in Patients with Placental Dysfunction ». *Molecular Reproduction and Development* 75 (1): 175-183. doi:10.1002/mrd.20729.
- Leikina, Evgenia, Kamran Melikov, Sarmistha Sanyal, Santosh K. Verma, Bokkee Eun, Claudia Gebert, Karl Pfeifer, Vladimir A. Lizunov, Michael M. Kozlov, et Leonid V. Chernomordik. 2013. « Extracellular Annexins and Dynamin Are Important for Sequential Steps in Myoblast Fusion ». *The Journal of Cell Biology* 200 (1): 109-123. doi:10.1083/jcb.201207012.
- Lek, Angela, Frances J. Evesson, Frances A. Lemckert, Gregory M. I. Redpath, Ann-Katrin Lueders, Lynne Turnbull, Cynthia B. Whitchurch, Kathryn N. North, et Sandra T. Cooper. 2013. « Calpains, Cleaved Mini-DysferlinC72, and L-Type Channels Underpin Calcium-Dependent Muscle Membrane Repair ». *The Journal of Neuroscience* 33 (12): 5085-5094. doi:10.1523/JNEUROSCI.3560-12.2013.
- Lek, Angela, Frances J. Evesson, R. Bryan Sutton, Kathryn N. North, et Sandra T. Cooper. 2012. « Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair ». *Traffic* 13 (2): 185-194. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x.
- Lek, Angela, Monkol Lek, Kathryn N. North, et Sandra T. Cooper. 2010. « Phylogenetic Analysis of Ferlin Genes Reveals Ancient Eukaryotic Origins ». *BMC Evolutionary Biology* 10 (1): 231. doi:10.1186/1471-2148-10-231.
- Lemmon, Mark A. 2008. « Membrane Recognition by Phospholipid-Binding Domains ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2): 99-111. doi:10.1038/nrm2328.
- Lennon, Niall J., Alvin Kho, Brian J. Bacskaï, Sarah L. Perlmutter, Bradley T. Hyman, et Robert H. Brown. 2003a. « Dysferlin Interacts with Annexins A1 and A2 and Mediates Sarcolemmal Wound-Healing ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (50): 50466-50473. doi:10.1074/jbc.M307247200.
- Leonard, Prof Thomas A. 2013. « C2 Domain Proteins ». In *Encyclopedia of Metalloproteins*, édité par Robert H. Kretsinger, Vladimir N. Uversky, et Eugene A. Permyakov, 309-318. Springer New York. http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4614-1533-6_39.
- Levy, Jennifer R, Kevin P Campbell, et David J Glass. 2013. « MG53's new identity ». *Skeletal Muscle* 3 (novembre): 25. doi:10.1186/2044-5040-3-25.
- Lewit-Bentley, A., S. Morera, R. Huber, et G. Bodo. 1992. « The Effect of Metal Binding on the Structure of Annexin V and Implications for Membrane Binding ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 210 (1): 73-77.
- Lewit-Bentley, Anita, et Stéphane Réty. 2000. « EF-hand calcium-binding proteins ». *Current Opinion in Structural Biology* 10 (6): 637-643. doi:10.1016/S0959-440X(00)00142-1.
- Ling, Qi, Andrew T. Jacovina, Arunkumar Deora, Maria Febbraio, Ronit Simantov, Roy L. Silverstein, Barbara Hempstead, Willie H. Mark, et Katherine A. Hajjar. 2004. « Annexin II

Bibliographie

- Regulates Fibrin Homeostasis and Neoangiogenesis in Vivo ». *The Journal of Clinical Investigation* 113 (1): 38-48. doi:10.1172/JCI19684.
- Liu, Jing, Masashi Aoki, Isabel Illa, Chenyan Wu, Michel Fardeau, Corrado Angelini, Carmen Serrano, et al. 1998. « Dysferlin, a Novel Skeletal Muscle Gene, Is Mutated in Miyoshi Myopathy and Limb Girdle Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 20 (1): 31-36. doi:10.1038/1682.
- Lizarbe, María Antonia, Juan I. Barrasa, Nieves Olmo, Francisco Gavilanes, et Javier Turnay. 2013. « Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2): 2652-283. doi:10.3390/ijms14022652.
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, et James Darnell. 2000a. « Actin and Myosin in Nonmuscle Cells ». <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21562/>.
- . 2000b. « Active Transport by ATP-Powered Pumps ». <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21481/>.
- Lorenzoni, Paulo J., Rosana H. Scola, Natassia Vieira, Mariz Vainzof, Ana L. M. Carsten, et Lineu C. Werneck. 2007. « A Novel Missense Mutation in the Caveolin-3 Gene in Rippling Muscle Disease ». *Muscle & Nerve* 36 (2): 258-60. doi:10.1002/mus.20781.
- Los, Ferdinand C. O., Cheng-Yuan Kao, Jane Smitham, Kent L. McDonald, Christine Ha, Christina A. Peixoto, et Raffi V. Aroian. 2011. « RAB-5 and RAB-11-dependent vesicle-trafficking pathways are required for plasma membrane repair after attack by bacterial pore-forming toxin ». *Cell host & microbe* 9 (2): 147-57. doi:10.1016/j.chom.2011.01.005.
- Madrid, Ricardo E., Christian Kubisch, et Arthur P. Hays. 2005. « Early-Onset Toe Walking in Rippling Muscle Disease due to a New Caveolin-3 Gene Mutation ». *Neurology* 65 (8): 1301-3. doi:10.1212/01.wnl.0000180963.85963.73.
- Malassiné, A., J. L. Frendo, et D. Evain-Brion. 2003. « A Comparison of Placental Development and Endocrine Functions between the Human and Mouse Model ». *Human Reproduction Update* 9 (6): 531-39.
- Malassiné, André, Jean-Louis Frendo, et Danièle Evain-Brion. 2010. « Trisomy 21- Affected Placentas Highlight Prerequisite Factors for Human Trophoblast Fusion and Differentiation ». *The International Journal of Developmental Biology* 54 (2-3): 475-82. doi:10.1387/ijdb.082766am.
- Marty, Naomi J., Chelsea L. Holman, Nazish Abdullah, et Colin P. Johnson. 2013. « The C2 Domains of Otoferlin, Dysferlin, and Myoferlin Alter the Packing of Lipid Bilayers ». *Biochemistry* 52 (33). doi:10.1021/bi400432f.
- Masuda, Junko, Eiji Takayama, Ayano Satoh, Michiru Ida, Tadashi Shinohara, Kyoko Kojima-Aikawa, Fumitaka Ohsuzu, et al. 2004. « Levels of Annexin IV and V Levels in the Plasma of Pregnant and Postpartum Women ». *Thrombosis and Haemostasis*, avril. doi:10.1160/TH03-12-0778.
- Matsuda, Chie, Yukiko K. Hayashi, Megumu Ogawa, Masashi Aoki, Kumiko Murayama, Ichizo Nishino, Ikuya Nonaka, Kiichi Arahata, et Robert H. Brown Jr. 2001. « The Sarcolemmal Proteins Dysferlin and Caveolin-3 Interact in Skeletal Muscle ». *Human Molecular Genetics* 10 (17): 1761-66. doi:10.1093/hmg/10.17.1761.
- McDade, Joel R., Ashley Archambeau, et Daniel E. Michele. 2014. « Rapid Actin-Cytoskeleton-dependent Recruitment of Plasma Membrane-derived Dysferlin at Wounds Is Critical for Muscle Membrane Repair ». *The FASEB Journal* 28 (8): 3660-70. doi:10.1096/fj.14-250191.
- McNally, E. M., E. de Sá Moreira, D. J. Duggan, C. G. Bönnemann, M. P. Lisanti, H. G. Lidov, M. Vainzof, et al. 1998. « Caveolin-3 in Muscular Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 7 (5): 871-77.
- McNeil, Anna K., Ursula Rescher, Volker Gerke, et Paul L. McNeil. 2006. « Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (46): 35202-7. doi:10.1074/jbc.M606406200.
- McNeil, Paul L., et Tom Kirchhausen. 2005. « An Emergency Response Team for Membrane Repair ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (6): 499-505. doi:10.1038/nrm1665.

Bibliographie

- McNeil, Paul L., et Richard A. Steinhardt. 2003. « Plasma membrane disruption: Repair, Prevention, Adaptation ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19 (1): 697-731. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.140101.
- McNeil, P. L., et S. Ito. 1989. « Gastrointestinal Cell Plasma Membrane Wounding and Resealing in Vivo ». *Gastroenterology* 96 (5 Pt 1): 1238-48.
- . 1990. « Molecular Traffic through Plasma Membrane Disruptions of Cells in Vivo ». *Journal of Cell Science* 96 (Pt 3) (juillet): 549-56.
- McNeil, P. L., et R. Khakee. 1992. « Disruptions of Muscle Fiber Plasma Membranes. Role in Exercise-Induced Damage ». *The American Journal of Pathology* 140 (5): 1097-1109.
- McNeil, P. L., et M. Terasaki. 2001. « Coping with the Inevitable: How Cells Repair a Torn Surface Membrane ». *Nature Cell Biology* 3 (5): E124-29. doi:10.1038/35074652.
- McNeil, P. L., S. S. Vogel, K. Miyake, et M. Terasaki. 2000. « Patching Plasma Membrane Disruptions with Cytoplasmic Membrane ». *Journal of Cell Science* 113 (Pt 11) (juin): 1891-1902.
- Mellgren, Ronald L., Wenli Zhang, Katsuya Miyake, et Paul L. McNeil. 2007. « Calpain Is Required for the Rapid, Calcium-Dependent Repair of Wounded Plasma Membrane ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (4): 2567-75. doi:10.1074/jbc.M604560200.
- Merlini, L., I. Carbone, C. Capanni, P. Sabatelli, S. Tortorelli, F. Sotgia, M. P. Lisanti, C. Bruno, et C. Minetti. 2002. « Familial Isolated hyperCKaemia Associated with a New Mutation in the Caveolin-3 (CAV-3) Gene ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 73 (1): 65-67.
- Miller, D. G., M. A. Adam, et A. D. Miller. 1990. « Gene Transfer by Retrovirus Vectors Occurs Only in Cells That Are Actively Replicating at the Time of Infection. » *Molecular and Cellular Biology* 10 (8): 4239-42. doi:10.1128/MCB.10.8.4239.
- Minetti, C., F. Sotgia, C. Bruno, P. Scartezzini, P. Broda, M. Bado, E. Masetti, et al. 1998. « Mutations in the Caveolin-3 Gene Cause Autosomal Dominant Limb-Girdle Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 18 (4): 365-68. doi:10.1038/ng0498-365.
- Mitchison, T. J., et L. P. Cramer. 1996. « Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion ». *Cell* 84 (3): 371-79. doi:10.1016/S0092-8674(00)81281-7.
- Miyake, K., et P. L. McNeil. 1995. « Vesicle Accumulation and Exocytosis at Sites of Plasma Membrane Disruption ». *The Journal of Cell Biology* 131 (6 Pt 2): 1737-45.
- Miyake, K., P. L. McNeil, K. Suzuki, R. Tsunoda, et N. Sugai. 2001. « An Actin Barrier to Resealing ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 19): 3487-94.
- Mohiti, J., A. M. Caswell, et J. H. Walker. 1997. « The Nuclear Location of Annexin V in the Human Osteosarcoma Cell Line MG-63 Depends on Serum Factors and Tyrosine Kinase Signaling Pathways ». *Experimental Cell Research* 234 (1): 98-104. doi:10.1006/excr.1997.3584.
- Monastyrskaya, Katia, Eduard B. Babychuk, Andrea Hostettler, Ursula Rescher, et Annette Draeger. 2007. « Annexins as Intracellular Calcium Sensors ». *Cell Calcium* 41 (3): 207-19. doi:10.1016/j.ceca.2006.06.008.
- Morgan, B. P. 1989. « Complement Membrane Attack on Nucleated Cells: Resistance, Recovery and Non-Lethal Effects ». *The Biochemical Journal* 264 (1): 1-14.
- Morgan, B. P., et A. K. Campbell. 1985. « The recovery of human polymorphonuclear leucocytes from sublytic complement attack is mediated by changes in intracellular free calcium. » *Biochemical Journal* 231 (1): 205-8.
- Morgan, B. P., J. R. Dankert, et A. F. Esser. 1987. « Recovery of Human Neutrophils from Complement Attack: Removal of the Membrane Attack Complex by Endocytosis and Exocytosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 138 (1): 246-53.
- Morgan, B. P., J. P. Luzio, et A. K. Campbell. 1986. « Intracellular Ca²⁺ and cell injury: A paradoxical role of Ca²⁺ in complement membrane attack ». *Cell Calcium* 7 (5-6): 399-411. doi:10.1016/0143-4160(86)90042-4.
- Morgan, Reginald O., Silvia Martin-Almedina, Montserrat Garcia, Jorge Jhoncon-Kooyip, et Maria-Pilar Fernandez. 2006. « Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell*

Bibliographie

- Research*, 9th European Symposium on Calcium, 1763 (11): 1238-1249. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.028.
- Mortimer, I, P Tam, I MacLachlan, R W Graham, E G Saravolac, et P B Joshi. 1999. « Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity ». *Gene Therapy* 6 (3): 403-411. doi:10.1038/sj.gt.3300837.
- Mosser, Gervaise, Catherine Ravanat, Jean-Marie Freyssinet, et Alain Brisson. 1991. « Sub-domain structure of lipid-bound annexin-V resolved by electron image analysis ». *Journal of Molecular Biology* 217 (2): 241-245. doi:10.1016/0022-2836(91)90538-H.
- Moss, Stephen E, et Reg O Morgan. 2004. « The annexins ». *Genome Biology* 5 (4): 219.
- Movitz, Charlotta, Carola Sjölin, et Claes Dahlgren. 1999. « Cleavage of annexin I in human neutrophils is mediated by a membrane-localized metalloprotease ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1416 (1-2): 101-108. doi:10.1016/S0005-2736(98)00212-0.
- Mo, Youde, Begoña Campos, Tanya R. Mealy, Lois Commodore, James F. Head, John R. Dedman, et Barbara A. Seaton. 2003. « Interfacial Basic Cluster in Annexin V Couples Phospholipid Binding and Trimer Formation on Membrane Surfaces ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (4): 2437-2443. doi:10.1074/jbc.M210286200.
- Müller, Juliane S., Henriett Piko, Benedikt G. H. Schoser, Beate Schlotter-Weigel, Peter Reilich, Stefanie Gürster, Christine Born, et al. 2006. « Novel Splice Site Mutation in the Caveolin-3 Gene Leading to Autosomal Recessive Limb Girdle Muscular Dystrophy ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 16 (7): 432-436. doi:10.1016/j.nmd.2006.04.006.
- Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, et D. Trono. 1996. « In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5259): 263-267.
- Nalefski, E. A., et J. J. Falke. 1996. « The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. » *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 5 (12): 2375-2390.
- Nichols, Ben. 2003. « Caveosomes and Endocytosis of Lipid Rafts ». *Journal of Cell Science* 116 (23): 4707-4714. doi:10.1242/jcs.00840.
- Odorizzi, Greg. 2006. « The Multiple Personalities of Alix ». *Journal of Cell Science* 119 (15): 3025-3032. doi:10.1242/jcs.03072.
- Oeckler, Richard A., Won-Yeon Lee, Mun-Gi Park, Othmar Kofler, Deborah L. Rasmussen, Heung-Bum Lee, Hewan Belete, Bruce J. Walters, Randolph W. Stroetz, et Rolf D. Hubmayr. 2010. « Determinants of plasma membrane wounding by deforming stress ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 299 (6): L826-L833. doi:10.1152/ajplung.00217.2010.
- Oling, Frank, Wilma Bergsma-Schutter, et Alain Brisson. 2001. « Trimers, Dimers of Trimers, and Trimers of Trimers Are Common Building Blocks of Annexin A5 Two-Dimensional Crystals ». *Journal of Structural Biology* 133 (1): 55-63. doi:10.1006/jsbi.2000.4337.
- Ono, Yasuko, et Hiroyuki Sorimachi. 2012. « Calpains — An elaborate proteolytic system ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Proteolysis 50 years after the discovery of lysosome, 1824 (1): 224-236. doi:10.1016/j.bbapap.2011.08.005.
- Ozato, Keiko, Dong-Mi Shin, Tsung-Hsien Chang, et Herbert C. Morse. 2008. « TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity ». *Nature reviews. Immunology* 8 (11): 849-860. doi:10.1038/nri2413.
- Paine, Philip L., Leonard C. Moore, et Samuel B. Horowitz. 1975. « Nuclear Envelope Permeability ». *Nature* 254 (5496): 109-114. doi:10.1038/254109a0.
- Park, Eun Young, Oh-Bong Kwon, Byung-Cheon Jeong, Jae-Sung Yi, Chang Seok Lee, Young-Gyu Ko, et Hyun Kyu Song. 2010. « Crystal Structure of PRY-SPRY Domain of Human TRIM72 ». *Proteins* 78 (3): 790-795. doi:10.1002/prot.22647.
- Parton, Robert G., et Miguel A. del Pozo. 2013. « Caveolae as Plasma Membrane Sensors, Protectors and Organizers ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (2): 98-112. doi:10.1038/nrm3512.

Bibliographie

- Parton, Robert G., Michael Way, Natasha Zorzi, et Espen Stang. 1997. « Caveolin-3 Associates with Developing T-Tubules during Muscle Differentiation ». *The Journal of Cell Biology* 136 (1): 137-54. doi:10.1083/jcb.136.1.137.
- Pelkmans, Lucas, et Marino Zerial. 2005. « Kinase-Regulated Quantal Assemblies and Kiss-and-Run Recycling of Caveolae ». *Nature* 436 (7047): 128-33. doi:10.1038/nature03866.
- Philippi, Susanne, Anne Bigot, Andreas Marg, Vincent Mouly, Simone Spuler, et Ute Zacharias. 2012. « Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy ». *PLoS Currents* 4 (février). doi:10.1371/currents.RRN1298.
- Pidoux, Guillaume, Pascale Gerbaud, Jim Dompierre, Birgitte Lygren, Therese Solstad, Danièle Evain-Brion, et Kjetil Taskén. 2014. « A PKA-ezrin-Cx43 Signaling Complex Controls Gap Junction Communication and Thereby Trophoblast Cell Fusion ». *Journal of Cell Science* 127 (19): 4172-85. doi:10.1242/jcs.149609.
- Pigault, Claire, Anny Follenius-Wund, Marc Schmutz, Jean-Marie Freyssinet, et Alain Brisson. 1994. « Formation of Two-Dimensional Arrays of Annexin V on Phosphatidylserine-Containing Liposomes ». *Journal of Molecular Biology* 236 (1): 199-208. doi:10.1006/jmbi.1994.1129.
- Pinkney, M., E. Beachey, et M. Kehoe. 1989. « The Thiol-Activated Toxin Streptolysin O Does Not Require a Thiol Group for Cytolytic Activity ». *Infection and Immunity* 57 (8): 2553-58.
- Piper, R. C., et J. P. Luzio. 2001. « Late Endosomes: Sorting and Partitioning in Multivesicular Bodies ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (9): 612-21.
- « Plasma membrane repair provides a new strategy for targeting metastatic cancer cells ». 2015. *Cancer Cell & Microenvironment*, mars. doi:10.14800/ccm.446.
- Plopper, George. 2012. *Principles of Cell Biology*. Jones & Bartlett Publishers.
- Pollard, Thomas D., et John A. Cooper. 2009. « Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5957): 1208-12. doi:10.1126/science.1175862.
- Poon, Ellen, Emily V. Howman, Sarah E. Newey, et Kay E. Davies. 2002. « Association of Syncoilin and Desmin linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (5): 3433-39. doi:10.1074/jbc.M105273200.
- Potez, Sarah, Miriam Luginbühl, Katia Monastyrskaya, Andrea Hostettler, Annette Draeger, et Eduard B. Babiychuk. 2011. « Tailored Protection against Plasmalemmal Injury by Annexins with Different Ca²⁺ Sensitivities ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (20): 17982-91. doi:10.1074/jbc.M110.187625.
- Qu, Y., L. Franchi, G. Nunez, et G. R. Dubyak. 2007. « Nonclassical IL-1 Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages ». *The Journal of Immunology* 179 (3): 1913-25. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1913.
- Raedler, J., H. Strey, et E. Sackmann. 1995. « Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces ». *Langmuir* 11 (11): 4539-48. doi:10.1021/la00011a058.
- Rambotti, M. G., A. Spreca, et R. Donato. 1993. « Immunocytochemical Localization of Annexins V and VI in Human Placentae of Different Gestational Ages ». *Cellular & Molecular Biology Research* 39 (6): 579-88.
- Rand, Jacob H., et Xiao-Xuan Wu. 2004. « Antibody-Mediated Interference with Annexins in the Antiphospholipid Syndrome ». *Thrombosis Research* 114 (5-6): 383-89. doi:10.1016/j.thromres.2004.07.021.
- Raucher, D., et M. P. Sheetz. 2000. « Cell Spreading and Lamellipodial Extension Rate Is Regulated by Membrane Tension ». *The Journal of Cell Biology* 148 (1): 127-36.
- Raynal, P., et H. B. Pollard. 1994. « Annexins: The Problem of Assessing the Biological Role for a Gene Family of Multifunctional Calcium- and Phospholipid-Binding Proteins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1197 (1): 63-93.
- Razani, B., et M. P. Lisanti. 2001. « Caveolins and Caveolae: Molecular and Functional Relationships ». *Experimental Cell Research* 271 (1): 36-44. doi:10.1006/excr.2001.5372.
- Reddy, A., E. V. Caler, et N. W. Andrews. 2001. « Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca(2+)-Regulated Exocytosis of Lysosomes ». *Cell* 106 (2): 157-69.

Bibliographie

- Redman, C. W. G., et I. L. Sargent. 2000. « Placental Debris, Oxidative Stress and Pre-eclampsia ». *Placenta* 21 (7): 597-602. doi:10.1053/plac.2000.0560.
- Redpath, G. M. I., N. Woolger, A. K. Piper, F. A. Lemckert, A. Lek, P. A. Greer, K. N. North, et S. T. Cooper. 2014. « Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (19): 3037-48. doi:10.1091/mbc.E14-04-0947.
- Reijneveld, Jaap C., Ieke B. Ginjaar, Wendy S. Frankhuizen, et Nicolette C. Notermans. 2006. « CAV3 Gene Mutation Analysis in Patients with Idiopathic Hyper-CK-Emia ». *Muscle & Nerve* 34 (5): 656-58. doi:10.1002/mus.20593.
- Renault, Valérie, Lars-Eric Thornell, Per-Olof Eriksson, Gillian Butler-Browne, Vincent Mouly, et Lars-Eric Thorne. 2002. « Regenerative Potential of Human Skeletal Muscle during Aging ». *Aging Cell* 1 (2): 132-39.
- Rescher, Ursula, et Volker Gerke. 2004. « Annexins--Unique Membrane Binding Proteins with Diverse Functions ». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 13): 2631-39. doi:10.1242/jcs.01245.
- Reviakine, null, null Bergsma-Schutter, et null Brisson. 1998. « Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged in Situ by AFM ». *Journal of Structural Biology* 121 (3): 356-61. doi:10.1006/jsbi.1998.4003.
- Rezgui, Sophia Smida, Stéphane Vassilopoulos, Julie Brocard, Jean Claude Platel, Alexandre Bouron, Christophe Arnoult, Sarah Oddoux, Luis Garcia, Michel De Waard, et Isabelle Marty. 2005. « Triadin (Trisk 95) Overexpression Blocks Excitation-Contraction Coupling in Rat Skeletal Myotubes ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (47): 39302-8. doi:10.1074/jbc.M506566200.
- Richter, Ralf P., Joséphine Lai Kee Him, Béatrice Tessier, Céline Tessier, et Alain R. Brisson. 2005. « On the Kinetics of Adsorption and Two-Dimensional Self-Assembly of Annexin A5 on Supported Lipid Bilayers ». *Biophysical Journal* 89 (5): 3372-85. doi:10.1529/biophysj.105.064337.
- Ríos, Eduardo, Jianjie Ma, et Adom González. 1991. « The Mechanical Hypothesis of Excitation—contraction (EC) Coupling in Skeletal Muscle ». *Journal of Muscle Research & Cell Motility* 12 (2): 127-35. doi:10.1007/BF01774031.
- Rivero, F., B. Köppel, B. Peracino, S. Bozzaro, F. Siegert, C. J. Weijer, M. Schleicher, R. Albrecht, et A. A. Noegel. 1996. « The Role of the Cortical Cytoskeleton: F-Actin Crosslinking Proteins Protect against Osmotic Stress, Ensure Cell Size, Cell Shape and Motility, and Contribute to Phagocytosis and Development ». *Journal of Cell Science* 109 (Pt 11) (novembre): 2679-91.
- Römisch, J., E. Schüler, B. Bastian, T. Bürger, F. G. Dunkel, A. Schwinn, A. A. Hartmann, et E. P. Pâques. 1992. « Annexins I to VI: Quantitative Determination in Different Human Cell Types and in Plasma after Myocardial Infarction ». *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 3 (1): 11-17.
- Roostalu, Urmas, et Uwe Strähle. 2012. « In Vivo Imaging of Molecular Interactions at Damaged Sarcolemma ». *Developmental Cell* 22 (3): 515-29. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.008.
- Rosales, Xiomara Q., Sean J. Moser, Tam Tran, Beth McCarthy, Nicholas Dunn, Philip Habib, Orlando P. Simonetti, Jerry R. Mendell, et Subha V. Raman. 2011. « Cardiovascular Magnetic Resonance of Cardiomyopathy in Limb Girdle Muscular Dystrophy 2B and 2I ». *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 13 (1): 39. doi:10.1186/1532-429X-13-39.
- Rosengarth, Anja, et Hartmut Luecke. 2003. « A Calcium-Driven Conformational Switch of the N-Terminal and Core Domains of Annexin A1 ». *Journal of Molecular Biology* 326 (5): 1317-25.
- Scheffer, Luana L., Sen Chandra Sreetama, Nimisha Sharma, Sushma Medikayala, Kristy J. Brown, Aurelia Defour, et Jyoti K. Jaiswal. 2014. « Mechanism of Ca²⁺-Triggered ESCRT Assembly and Regulation of Cell Membrane Repair ». *Nature Communications* 5 (décembre). doi:10.1038/ncomms6646.
- Schlaepfer, D. D., et H. T. Haigler. 1987. « Characterization of Ca²⁺-Dependent Phospholipid Binding and Phosphorylation of Lipocortin I. » *Journal of Biological Chemistry* 262 (14): 6931-37.

Bibliographie

- . 1990. « Expression of Annexins as a Function of Cellular Growth State ». *The Journal of Cell Biology* 111 (1): 229–38.
- Schmidt, Oliver, et David Teis. 2012. « The ESCRT machinery ». *Current Biology* 22 (4): R116–20. doi:10.1016/j.cub.2012.01.028.
- Schuh, Amber L., et Anjon Audhya. 2014. « The ESCRT machinery: From the plasma membrane to endosomes and back again ». *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 49 (3): 242–61. doi:10.3109/10409238.2014.881777.
- Seaton, Barbara A., et John R. Dedman. 1998. « Annexins ». *Biometals* 11 (4): 399–404. doi:10.1023/A:1009205925714.
- Seifert, Udo. 1997. « Configurations of fluid membranes and vesicles ». *Advances in Physics* 46 (1): 13–137. doi:10.1080/00018739700101488.
- Selbert, Stefan, Petra Fischer, Andre Menke, Harald Jockusch, Dieter Pongratz, et Angelika A. Noegel. 1996. « Annexin VII Relocalization as a Result of Dystrophin Deficiency ». *Experimental Cell Research* 222 (1): 199–208. doi:10.1006/excr.1996.0025.
- Shankar, Jay, Anat Messenberg, Jackie Chan, T. Michael Underhill, Leonard J. Foster, et Ivan R. Nabi. 2010. « Pseudopodial Actin Dynamics Control Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastatic Cancer Cells ». *Cancer Research* 70 (9): 3780–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4439.
- Shesham, Rohini D., Libero J. Bartolotti, et Yumin Li. 2008. « Molecular Dynamics Simulation Studies on Ca²⁺-Induced Conformational Changes of Annexin I ». *Protein Engineering Design and Selection* 21 (2): 115–20. doi:10.1093/protein/gzm094.
- Silva, W. I., H. M. Maldonado, G. Velázquez, J. O. García, et F. A. González. 2007. « Caveolins in Glial Cell Model Systems: From Detection to Significance ». *Journal of Neurochemistry* 103 Suppl 1 (novembre): 101–12. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04712.x.
- Singer, S. J., et G. L. Nicolson. 1972. « The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes ». *Science (New York, N.Y.)* 175 (4023): 720–31.
- Sinha, Bidisha, Darius Köster, Richard Ruez, Pauline Gonnord, Michele Bastiani, Daniel Abankwa, Radu V. Stan, et al. 2011. « Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae ». *Cell* 144 (3): 402–13. doi:10.1016/j.cell.2010.12.031.
- Sjöblom, B., A. Salmazo, et K. Djinić-Carugo. 2008. « Alpha-Actinin Structure and Regulation ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (17): 2688–2701. doi:10.1007/s00018-008-8080-8.
- Skrahina, Tatsiana, Alen Piljić, et Carsten Schultz. 2008. « Heterogeneity and timing of translocation and membrane-mediated assembly of different annexins ». *Experimental Cell Research* 314 (5): 1039–47. doi:10.1016/j.yexcr.2007.11.015.
- Slotte, J. Peter, et Bodil Ramstedt. 2007. « The Functional Role of Sphingomyelin in Cell Membranes ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 109 (10): 977–81. doi:10.1002/ejlt.200700024.
- Smythe, Gayle M., Joshua C. Eby, Marie-Helene Disatnik, et Thomas A. Rando. 2003. « A Caveolin-3 Mutant That Causes Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 1C Disrupts Src Localization and Activity and Induces Apoptosis in Skeletal Myotubes ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 23): 4739–49. doi:10.1242/jcs.00806.
- Song, Kenneth S., Philipp E. Scherer, ZhaoLan Tang, Takashi Okamoto, Shengwen Li, Mark Chafel, Caryn Chu, D. Steve Kohtz, et Michael P. Lisanti. 1996. « Expression of Caveolin-3 in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (25): 15160–65. doi:10.1074/jbc.271.25.15160.
- Sopkova, Jana, Céline Raguenes-Nicol, Michel Vincent, Anne Chevalier, Anita Lewit-Bentley, Françoise Russo-Marie, et Jacques Gally. 2002. « Ca²⁺ and membrane binding to annexin 3 modulate the structure and dynamics of its N terminus and domain III ». *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 11 (7): 1613–25.
- Sotgia, Federica, Scott E. Woodman, Gloria Bonuccelli, Franco Capozza, Carlo Minetti, Philipp E. Scherer, et Michael P. Lisanti. 2003. « Phenotypic Behavior of Caveolin-3 R26Q, a Mutant

Bibliographie

- Associated with hyperCKemia, Distal Myopathy, and Rippling Muscle Disease ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 285 (5): C1150-60. doi:10.1152/ajpcell.00166.2003.
- Sotgia, F., J. K. Lee, K. Das, M. Bedford, T. C. Petrucci, P. Macioce, M. Sargiacomo, et al. 2000. « Caveolin-3 Directly Interacts with the C-Terminal Tail of Beta -Dystroglycan. Identification of a Central WW-like Domain within Caveolin Family Members ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (48): 38048-58. doi:10.1074/jbc.M005321200.
- Stave, Uwe. 2013. *Perinatal Physiology*. Springer Science & Business Media.
- Steinberg, Susan F. 2008. « Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function ». *Physiological Reviews* 88 (4): 1341-78. doi:10.1152/physrev.00034.2007.
- Steinhardt, R. A., G. Bi, et J. M. Alderton. 1994. « Cell Membrane Resealing by a Vesicular Mechanism Similar to Neurotransmitter Release ». *Science (New York, N.Y.)* 263 (5145): 390-93.
- Sugie, Kazuma, Kumiko Murayama, Satoru Noguchi, Nobuyuki Murakami, Mika Mochizuki, Yukiko K. Hayashi, Ikuya Nonaka, et Ichizo Nishino. 2004. « Two Novel CAV3 Gene Mutations in Japanese Families ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 14 (12): 810-14. doi:10.1016/j.nmd.2004.08.008.
- Sula, Altin, Ambrose R. Cole, Corin Yeats, Christine Orenge, et Nicholas H. Keep. 2014. « Crystal Structures of the Human Dysferlin Inner DysF Domain ». *BMC Structural Biology* 14 (1): 3. doi:10.1186/1472-6807-14-3.
- Surette, Alexi P., Patricia A. Madureira, Kyle D. Phipps, Victoria A. Miller, Per Svenningsson, et David M. Waisman. 2011. « Regulation of Fibrinolysis by S100A10 in Vivo ». *Blood* 118 (11): 3172-81. doi:10.1182/blood-2011-05-353482.
- Swaggart, Kayleigh A., Alexis R. Demonbreun, Andy H. Vo, Kaitlin E. Swanson, Ellis Y. Kim, John P. Fahrenbach, Jenan Holley-Cuthrell, et al. 2014. « Annexin A6 Modifies Muscular Dystrophy by Mediating Sarcolemmal Repair ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (16): 6004-9. doi:10.1073/pnas.1324242111.
- Swairjo M A, et Seaton B. A. 1994. « Annexin Structure and Membrane Interactions: A Molecular Perspective ». *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 23 (1): 193-213. doi:10.1146/annurev.bb.23.060194.001205.
- Tait, J. F., D. Gibson, et K. Fujikawa. 1989. « Phospholipid Binding Properties of Human Placental Anticoagulant Protein-I, a Member of the Lipocortin Family. » *Journal of Biological Chemistry* 264 (14): 7944-49.
- Tait, J. F., M. Sakata, B. A. McMullen, C. H. Miao, T. Funakoshi, L. E. Hendrickson, et K. Fujikawa. 1988. « Placental Anticoagulant Proteins: Isolation and Comparative Characterization Four Members of the Lipocortin Family ». *Biochemistry* 27 (17): 6268-76.
- Tajbakhsh, S. 2009. « Skeletal Muscle Stem Cells in Developmental versus Regenerative Myogenesis ». *Journal of Internal Medicine* 266 (4): 372-89. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02158.x.
- Tam, Christina, Vincent Idone, Cecilia Devlin, Maria Cecilia Fernandes, Andrew Flannery, Xingxuan He, Edward Schuchman, Ira Tabas, et Norma W. Andrews. 2010. « Exocytosis of Acid Sphingomyelinase by Wounded Cells Promotes Endocytosis and Plasma Membrane Repair ». *The Journal of Cell Biology* 189 (6): 1027-38. doi:10.1083/jcb.201003053.
- Tennyson, Christine N., Henry J. Klamut, et Ronald G. Worton. 1995. « The Human Dystrophin Gene Requires 16 Hours to Be Transcribed and Is Cotranscriptionally Spliced ». *Nature Genetics* 9 (2): 184-90. doi:10.1038/ng0295-184.
- Terasaki, Mark, Katsuya Miyake, et Paul L. McNeil. 1997. « Large Plasma Membrane Disruptions Are Rapidly Resealed by Ca²⁺-dependent Vesicle-Vesicle Fusion Events ». *The Journal of Cell Biology* 139 (1): 63-74.
- « The Dynamics of Living Protoplasm - ScienceDirect ». 2015. Consulté le août 25. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9781483232928>.
- Thelestam, M., et R. Möllby. 1983. « Survival of Cultured Cells after Functional and Structural Disorganization of Plasma Membrane by Bacterial Haemolysins and Phospholipases ». *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 21 (6): 805-15.

Bibliographie

- « Thermodynamics 5: Lipid bilayers - Biological Physics - biologicalphysics.iop.org ». 2015. Consulté le septembre 14. <http://biologicalphysics.iop.org/cws/article/lectures/45794>.
- Therrien, Christian, Sabrina Di Fulvio, Sarah Pickles, et Michael Sinnreich. 2009. « Characterization of Lipid Binding Specificities of Dysferlin C2 Domains Reveals Novel Interactions with Phosphoinositides† ». *Biochemistry* 48 (11): 2377-2384. doi:10.1021/bi802242r.
- Timmel, Tobias, Severine Kunz, Franziska Seifert, Markus Schuelke, et Simone Spuler. 2015. « Cavin 1 Function Does Not Follow Caveolar Morphology ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, avril, ajpcell.00329.2014. doi:10.1152/ajpcell.00329.2014.
- Tiscornia, Gustavo, Oded Singer, Masahito Ikawa, et Inder M. Verma. 2003. « A General Method for Gene Knockdown in Mice by Using Lentiviral Vectors Expressing Small Interfering RNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (4): 1844-1848. doi:10.1073/pnas.0437912100.
- Togo, T., J. M. Alderton, G. Q. Bi, et R. A. Steinhardt. 1999. « The Mechanism of Facilitated Cell Membrane Resealing ». *Journal of Cell Science* 112 (5): 719-731.
- « Traité des Variations de Système Musculaire de l'Homme, et leur Signification au Point de Vue de l'Anthropologie Zoologique ». 1898. *Journal of Anatomy and Physiology* 32 (Pt 3): 608-612.
- Traverso, M., C. Bruno, A. Broccolini, F. Sotgia, M. A. Donati, S. Assereto, E. Gazzo, et al. 2008. « Truncation of Caveolin-3 Causes Autosomal-Recessive Rippling Muscle Disease ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 79 (6): 735-737. doi:10.1136/jnnp.2007.133207.
- Traverso, Monica, Elisabetta Gazzo, Stefania Assereto, Federica Sotgia, Roberta Biancheri, Silvia Stringara, Laura Giberti, et al. 2008. « Caveolin-3 T78M and T78K Missense Mutations Lead to Different Phenotypes in Vivo and in Vitro ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 88 (3): 275-283. doi:10.1038/labinvest.3700713.
- Tweten, Rodney K. 2005. « Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins ». *Infection and Immunity* 73 (10): 6199-6209. doi:10.1128/IAI.73.10.6199-6209.2005.
- Tzima, E., P. J. Trotter, M. A. Orchard, et J. H. Walker. 1999. « Annexin V Binds to the Actin-Based Cytoskeleton at the Plasma Membrane of Activated Platelets ». *Experimental Cell Research* 251 (1): 185-193. doi:10.1006/excr.1999.4553.
- Udd, Bjarne. 2012. « Distal Myopathies--New Genetic Entities Expand Diagnostic Challenge ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 22 (1): 5-12. doi:10.1016/j.nmd.2011.10.003.
- Ueyama, H., H. Horinouchi, K. Obayashi, M. Hashinaga, T. Okazaki, et T. Kumamoto. 2007. « Novel homozygous mutation of the caveolin-3 gene in rippling muscle disease with extraocular muscle paresis ». *Neuromuscular Disorders* 17 (7): 558-561. doi:10.1016/j.nmd.2007.03.009.
- Vallet, Marion, et Ivan Tack. 2012. « Physiologie du calcium et des phosphates ». *Revue du Rhumatisme Monographies, Métabolisme phospho-calcique*, 79 (4): 203-209. doi:10.1016/j.monrhu.2012.07.006.
- Van den Bergh, P. Y. K., J. M. Gérard, J. A. Eloise, M. U. Manto, C. Kubisch, et B. G. H. Schoser. 2004. « Novel Missense Mutation in the Caveolin-3 Gene in a Belgian Family with Rippling Muscle Disease ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 75 (9): 1349-1351. doi:10.1136/jnnp.2003.028217.
- Vandré, Dale D., William E. Ackerman, Douglas A. Kniss, Arun K. Tewari, Miki Mori, Toshihiro Takizawa, et John M. Robinson. 2007. « Dysferlin Is Expressed in Human Placenta but Does Not Associate with Caveolin ». *Biology of Reproduction* 77 (3): 533-542. doi:10.1095/biolreprod.107.062190.
- van Meer, Gerrit, Dennis R. Voelker, et Gerald W. Feigenson. 2008. « Membrane lipids: where they are and how they behave ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2): 112-124. doi:10.1038/nrm2330.
- Vatta, Matteo, Michael J. Ackerman, Bin Ye, Jonathan C. Makielski, Enoch E. Ughanze, Erica W. Taylor, David J. Tester, et al. 2006. « Mutant Caveolin-3 Induces Persistent Late Sodium Current and Is Associated with Long-QT Syndrome ». *Circulation* 114 (20): 2104-2112. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.635268.

Bibliographie

- Venkatachalam, Kartik, et Craig Montell. 2007. « TRP Channels ». *Annual Review of Biochemistry* 76 (1): 387-417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Verkleij, A. J., R. F. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn, et L. L. van Deenen. 1973. « The Asymmetric Distribution of Phospholipids in the Human Red Cell Membrane. A Combined Study Using Phospholipases and Freeze-Etch Electron Microscopy ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 323 (2): 178-93.
- Virel, Ana, et Lars Backman. 2004. « Molecular Evolution and Structure of Alpha-Actinin ». *Molecular Biology and Evolution* 21 (6): 1024-31. doi:10.1093/molbev/msh094.
- Voges, D., R. Berendes, A. Burger, P. Demange, W. Baumeister, et R. Huber. 1994. « Three-Dimensional Structure of Membrane-Bound Annexin V. A Correlative Electron Microscopy-X-Ray Crystallography Study ». *Journal of Molecular Biology* 238 (2): 199-213. doi:10.1006/jmbi.1994.1281.
- Volonte, Daniela, Aaron J. Peoples, et Ferruccio Galbiati. 2003. « Modulation of Myoblast Fusion by Caveolin-3 in Dystrophic Skeletal Muscle Cells: Implications for Duchenne Muscular Dystrophy and Limb-Girdle Muscular Dystrophy-1C ». *Molecular Biology of the Cell* 14 (10): 4075-88. doi:10.1091/mbc.E03-03-0161.
- Vorgerd, M., K. Ricker, F. Ziemssen, W. Kress, H. H. Goebel, W. A. Nix, C. Kubisch, B. G. Schoser, et W. Mortier. 2001. « A Sporadic Case of Rippling Muscle Disease Caused by a de Novo Caveolin-3 Mutation ». *Neurology* 57 (12): 2273-77.
- Waddell, Leigh B., Frances A. Lemckert, Xi F. Zheng, Jenny Tran, Frances J. Evesson, Joanne M. Hawkes, Angela Lek, et al. 2011. « Dysferlin, Annexin A1, and Mitsugumin 53 Are Upregulated in Muscular Dystrophy and Localize to Longitudinal Tubules of the T-System With Stretch ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 70 (4): 302-13. doi:10.1097/NEN.0b013e31821350b0.
- Walev, I., S. C. Bhakdi, F. Hofmann, N. Djonder, A. Valeva, K. Aktories, et S. Bhakdi. 2001. « Delivery of Proteins into Living Cells by Reversible Membrane Permeabilization with Streptolysin-O ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3185-90. doi:10.1073/pnas.051429498.
- Walev, I., E. Martin, D. Jonas, M. Mohamadzadeh, W. Müller-Klieser, L. Kunz, et S. Bhakdi. 1993. « Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. » *Infection and Immunity* 61 (12): 4972-79.
- Walev, I., M. Palmer, A. Valeva, U. Weller, et S. Bhakdi. 1995. « Binding, oligomerization, and pore formation by streptolysin O in erythrocytes and fibroblast membranes: detection of nonlytic polymers. » *Infection and Immunity* 63 (4): 1188-94.
- Walev, I., D. Tappe, E. Gulbins, et S. Bhakdi. 2000. « Streptolysin O-Permeabilized Granulocytes Shed L-Selectin Concomitantly with Ceramide Generation via Neutral Sphingomyelinase ». *Journal of Leukocyte Biology* 68 (6): 865-72.
- Walter, Maggie C., Christian Braun, Matthias Vorgerd, Maja Poppe, Christian Thirion, Carolin Schmidt, Herbert Schreiber, et al. 2003. « Variable Reduction of Caveolin-3 in Patients with LGMD2B/MM ». *Journal of Neurology* 250 (12): 1431-38. doi:10.1007/s00415-003-0234-x.
- Wang, Li, Alexey J. Merz, Kevin M. Collins, et William Wickner. 2003. « Hierarchy of protein assembly at the vertex ring domain for yeast vacuole docking and fusion ». *The Journal of Cell Biology* 160 (3): 365-74. doi:10.1083/jcb.200209095.
- Wang, Li, E. Scott Seeley, William Wickner, et Alexey J. Merz. 2002. « Vacuole Fusion at a Ring of Vertex Docking Sites Leaves Membrane Fragments within the Organelle ». *Cell* 108 (3): 357-69.
- Wang, Xiuqiong, Begoña Campos, Marcia A. Kaetzel, et John R. Dedman. 1999. « Annexin V is critical in the maintenance of murine placental integrity ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 180 (4): 1008-16. doi:10.1016/S0002-9378(99)70674-5.
- Wang, Yuping, et Shuang Zhao. 2010. *Vascular Biology of the Placenta*. Integrated Systems Physiology: From Molecules to Function to Disease. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53247/>.

Bibliographie

- Wang, Yu Xin, et Michael A. Rudnicki. 2012. « Satellite Cells, the Engines of Muscle Repair ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (2): 127–133. doi:10.1038/nrm3265.
- Watkins, S. C., et M. J. Cullen. 1988. « A Quantitative Study of Myonuclear and Satellite Cell Nuclear Size in Duchenne's Muscular Dystrophy, Polymyositis and Normal Human Skeletal Muscle ». *The Anatomical Record* 222 (1): 6–11. doi:10.1002/ar.1092220103.
- Weiland, Malin E. -L., Andrew G. McArthur, Hilary G. Morrison, Mitchell L. Sogin, et Staffan G. Svärd. 2005. « Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeletal gene family in *Giardia lamblia* ». *International Journal for Parasitology* 35 (6): 617–626. doi:10.1016/j.ijpara.2004.12.009.
- Weinberg, J. M., J. A. Davis, et M. A. Venkatachalam. 1997. « Cytosolic-Free Calcium Increases to Greater than 100 Micromolar in ATP-Depleted Proximal Tubules ». *The Journal of Clinical Investigation* 100 (3): 713–722. doi:10.1172/JCI119584.
- Weintraub, H., R. Davis, S. Tapscott, M. Thayer, M. Krause, R. Benezra, T. K. Blackwell, D. Turner, R. Rupp, et S. Hollenberg. 1991. « The myoD Gene Family: Nodal Point during Specification of the Muscle Cell Lineage ». *Science (New York, N.Y.)* 251 (4995): 761–766.
- Weisleder, Noah, Hiroshi Takeshima, et Jianjie Ma. 2008. « Immuno-proteomic approach to excitation–contraction coupling in skeletal and cardiac muscle: Molecular insights revealed by the mitsugumins ». *Cell calcium* 43 (1): 1–8. doi:10.1016/j.ceca.2007.10.006.
- Weisleder, Noah, Norio Takizawa, Peihui Lin, Xianhua Wang, Chunmei Cao, Yan Zhang, Tao Tan, et al. 2012. « Recombinant MG53 Protein Modulates Therapeutic Cell Membrane Repair in Treatment of Muscular Dystrophy ». *Science Translational Medicine* 4 (139): 139ra85. doi:10.1126/scitranslmed.3003921.
- Wenzel, Katrin, Christian Geier, Fatimunnisa Qadri, Norbert Hubner, Herbert Schulz, Bettina Erdmann, Volkmar Gross, et al. 2007. « Dysfunction of Dysferlin-Deficient Hearts ». *Journal of Molecular Medicine* 85 (11): 1203–1214. doi:10.1007/s00109-007-0253-7.
- Williams, Terence M, et Michael P Lisanti. 2004. « The caveolin proteins ». *Genome Biology* 5 (3): 214.
- Wollert, Thomas, Dong Yang, Xuefeng Ren, H. H. Lee, Y. J. Im, et James H. Hurley. 2009. « The ESCRT Machinery at a Glance ». *Journal of Cell Science* 122 (13): 2163–2166. doi:10.1242/jcs.029884.
- Xie, X. Y., et J. N. Barrett. 1991. « Membrane Resealing in Cultured Rat Septal Neurons after Neurite Transection: Evidence for Enhancement by Ca(2+)-Triggered Protease Activity and Cytoskeletal Disassembly ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 11 (10): 3257–3267.
- Xu, Li, Sandeep Pallikkuth, Zhanjia Hou, Gregory A. Mignery, Seth L. Robia, et Renzhi Han. 2011. « Dysferlin Forms a Dimer Mediated by the C2 Domains and the Transmembrane Domain In Vitro and in Living Cells ». *PLoS ONE* 6 (11). doi:10.1371/journal.pone.0027884.
- Yamaguchi, Hideki, et John Condeelis. 2007. « Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Integrated approaches to cytoskeleton research*, 1773 (5): 642–652. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.001.
- Yamaji, Ryoichi, Kayoko Fujita, Saeko Takahashi, Hiroko Yoneda, Kaori Nagao, Wataru Masuda, Mikihiro Naito, et al. 2003. « Hypoxia up-Regulates Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Mouse Brain Capillary Endothelial Cells: Involvement of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1593 (2-3): 269–276.
- Yáñez, Matilde, José Gil-Longo, et Manuel Campos-Toimil. 2012. « Calcium Binding Proteins ». In *Calcium Signaling*, édité par Md Shahidul Islam, 461–482. Advances in Experimental Medicine and Biology 740. Springer Netherlands. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-2888-2_19.
- Yu, Q. C., et P. L. McNeil. 1992. « Transient disruptions of aortic endothelial cell plasma membranes. » *The American Journal of Pathology* 141 (6): 1349–1360.
- Zacharias, Ute, Bettina Purfürst, Verena Schöwel, Ingo Morano, Simone Spuler, et Hannelore Haase. 2011. « Ahnak1 Abnormally Localizes in Muscular Dystrophies and Contributes to Muscle

Bibliographie

- Vesicle Release ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 32 (4-5): 271-280. doi:10.1007/s10974-011-9271-8.
- Zachowski, A. 1993. « Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. » *Biochemical Journal* 294 (Pt 1): 1-14.
- Zhao, Haibo, Yuji Ito, Jean Chappel, Norma W. Andrews, Steven L. Teitelbaum, et F. Patrick Ross. 2008. « Synaptotagmin VII Regulates Bone Remodeling by Modulating Osteoclast and Osteoblast Secretion ». *Developmental cell* 14 (6): 914-925. doi:10.1016/j.devcel.2008.03.022.
- Zha, X., L. M. Pierini, P. L. Leopold, P. J. Skiba, I. Tabas, et F. R. Maxfield. 1998. « Sphingomyelinase Treatment Induces ATP-Independent Endocytosis ». *The Journal of Cell Biology* 140 (1): 39-47.
- Zhelev, D. V., et D. Needham. 1993. « Tension-Stabilized Pores in Giant Vesicles: Determination of Pore Size and Pore Line Tension ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1147 (1): 89-104.
- Zhu, Chun-Hong, Vincent Mouly, Racquel N. Cooper, Kamel Mamchaoui, Anne Bigot, Jerry W. Shay, James P. Di Santo, Gillian S. Butler-Browne, et Woodring E. Wright. 2007. « Cellular Senescence in Human Myoblasts Is Overcome by Human Telomerase Reverse Transcriptase and Cyclin-Dependent Kinase 4: Consequences in Aging Muscle and Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophies ». *Aging Cell* 6 (4): 515-523. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00306.x.
- Zink, Daniele, Andrew H. Fischer, et Jeffrey A. Nickerson. 2004. « Nuclear Structure in Cancer Cells ». *Nature Reviews. Cancer* 4 (9): 677-687. doi:10.1038/nrc1430.